

06. 10. 2003

Rec'd

2003

10/525672

REC'D 17 OCT 2003

WIPO

PCT



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 05 607.6

Anmeldetag: 11. Februar 2003

Anmelder/Inhaber: Cell Center Cologne GmbH, Köln/DE

Bezeichnung: Immunogene MUC1-Glykopeptide

Priorität: 5.9.2002 DE 102 41 207.3

IPC: C 07 K 14/435

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 26. September 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

P15395

IMMUNOGENE MUC1-GLYKOPEPTIDE

5

Die vorliegende Erfindung betrifft MUC1-Peptidfragmente und betrifft Verfahren zur Herstellung solcher Peptidfragmente. Die Erfindung betrifft weiterhin ein *ex vivo*-Verfahren zur Herstellung einer Population autologer Antigen präsentierender Zellen (APCs) und zur Herstellung gentechnisch erzeugter APCs, die zur Induktion von effektiven Immunreaktionen gegen MUC1 in der Lage sind. Die Erfindung betrifft weiterhin APCs, die durch diese Verfahren gewinnbar sind, ebenso wie die Verwendung der oben erwähnten Fragmente und APCs in einer therapeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Brustkrebs und anderen MUC1-positiven Karzinomen, einschließlich kolorektalem Karzinom, Pankreas- und Magenkarzinom.

15

MUC1 wird in Brustkrebs- und vielen anderen Karzinomen überexprimiert und es ist bekannt, dass die Tumor-assoziierte Glykoform des Mucins innerhalb seiner Wiederholungs- bzw. Repeat-Domäne vielfältige Peptidepitope exponiert. Diese immunogenen Peptidepitope machen MUC1 zu einem viel versprechenden Tumorantigen mit einem diagnostischen wie auch therapeutischen Potential bei der Behandlung von Krebs.

20

Die Entwicklung einer wirksamen Vakzine bzw. Impfstoffes und von Immuntherapien gegen menschliche Krebserkrankungen und gegen infektiöse Substanzen hängen oftmals von der Erzeugung protektiver Immunreaktionen gegen spezifische Domänen von Membranproteinen ab. Die Tandem-Repeat-(TR-) Domäne des Brust-, Pankreas- und Ovar tumorantigens, des humanen Mucins MUC1 (Barnd et al., PNAS USA, 86: 7159-7163, 1989; Jerome et al., Cancer Res., 51: 2908-2916, 1991), die neutralisierende Hauptdomäne (principal neutralizing domain) von HIV-1 (Javaherian et al., PNAS USA, 86: 6768-6772, 1989; Javaherian et al., Science, 250: 1590-1593, 1990) und die Prolin-reiche Neutralisierungsdomäne (= prolin rich neutralization domain) des Außenoberflächeneinheits-Proteins des feline Leukämievirus (= feline leukemia virus external surface unit protein) (pg-70) (Nunberg et al., PNAS, 81: 3675-

25

30

3679, 1984; Elder et al., J. Virol., 61: 8-15, 1987; Strouss et al., J. Virol., 61: 3410-3415, 1987; Nick et al., J. Gen. Virol., 71: 77-83, 1990) sind Beispiele hierfür.

5 Bezüglich MUC1 wurden humorale und zelluläre Reaktionen bei Krebspatienten (1, 2), jedoch auch bei schwangeren Frauen (3) und gesunden Personen (4) gezeigt. Obwohl diese natürlichen Reaktionen üblicherweise nicht ausreichen, um das Fortschreiten von Krebs zu bekämpfen, werden von MUC1 stammende Peptide oder Glykopeptide gegenwärtig in klinischen Versuchen zur Auslösung von therapeutischen und prophylaktischen Immunreaktionen in Menschen verwendet (5, 6).

10

Es existieren zunehmende Beweise dafür, dass die Auslösung von effizienten humoralen und CTL-Reaktionen auf MUC1 der Aktivierung spezifischer T-Helferzell-Klone bedarf, die durch MHC-Klasse-II-präsentierte Antigenfragmente induziert wird. Die Erzeugung von MHC-Klasse-II-restringierten Peptidepitopen durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs),

15 wie dendritische Zellen (DCs), folgt einem mehrstufigen Verfahren, das mit der Endozytose beginnt, gefolgt von der Prozessierung bzw. Verarbeitung in den spät-endosomalen Kompartimenten und die Bindung proteolytischer Peptidfragmente an MHC-Klasse-II-Proteine und deren Transport zur Zelloberfläche zur Folge hat. Während viele Aspekte dieses komplexen Prozesses bereits ans Licht gebracht wurden, existiert gegenwärtig kaum ein Beweis für die Prozessierung und MHC-Klasse-II-Präsentation von glykosylierten Antigenen, insbesondere den stark O-glykosylierten Mucin-Antigenen. Um die Entwicklung effizienter Tumorstimmungen auf Grundlage von MUC1 zu ermöglichen, ist die Kenntnis, wie DCs oder andere APCs

20

O-glykosylierte Peptide behandeln, von Bedeutung. Eine besondere Frage in diesem Kontext betrifft das Schicksal komplexer O-gebundener Glykane während der Prozessierung, weil

25 eine effiziente Peptidfragmentierung eine vollständige oder teilweise Entfernung von Zuckern vor der Proteolyse mit sich bringen kann. O-gebundene Glykane können die Prozessierung auch bezüglich der Zugänglichkeit von Spaltstellen lenken und beschränken deswegen einerseits das Muster der Peptidfragmente, während sie andererseits das Muster der Epitope bereichern. Die Erfinder haben kürzlich durch immunologische Verfahren gezeigt, dass MUC1-Core- bzw. Kernglykane während der Prozessierung nicht entfernt werden, und dass Glykopeptide, die von MHC-Klasse-II präsentiert werden, zur Aktivierung von T-Zell-Hybridomen in der Lage sind (nicht veröffentlicht).

30

Obwohl mehrere Cathepsine als Bestandteile des Prozessierungsmechanismus identifiziert wurden (8, 9), ist gegenwärtig nicht bekannt, welches Enzym (welche Enzyme) in die Prozessierung bzw. Verarbeitung von MUC1 involviert sind und an welchen Stellen innerhalb der Repeat-Domäne sie tatsächlich das Protein spalten. Es steht zu erwarten, daß mehrere Spaltstellen existieren, und nur Subfraktionen der erzeugten Peptidfragmente sollten die Anforderungen zur Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle erfüllen. Es könnte somit ein wertvoller Ansatz zur Entwicklung neuer Anti-Krebsvakzinen darin liegen, neue immunogene MUC1-Fragmente zu identifizieren, die zur Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle in der Lage sind.

Es ist deswegen eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue immunogene MUC1-Peptidfragmente bereitzustellen, die bei Menschen zur Immunisierung verwendet werden können.

Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung eines immunogenen MUC1-Peptids bereitzustellen, das eine Erhaltung des ursprünglich enthaltenen Glykosylierungsmusters während des Produktionsverfahrens ermöglicht.

Diese Aufgaben werden durch die Gegenstände der unabhängigen Ansprüche gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen dargelegt.

20

Der Erfinder hat überraschenderweise herausgefunden, dass Cathepsin-L oder ein eng verwandtes Enzym ein sehr beschränktes Fragmentierungsmuster während der humanen und murinen DC-Prozessierung mit nur zwei bevorzugten Spaltstellen pro MUC1-Repeat zeigt. Die Spaltspezifität und die spezifische Hemmung der Protease stimmten mit der Annahme des Erfinders überein, dass Cathepsin-L oder ein eng verwandtes Enzym (Cathepsine B oder S) in diese hoch spezifische Spaltung involviert waren.

25

Der experimentelle Aufbau verwendete Kügelchen bzw. Perlen, die mit biotinylierten und nicht markierten synthetischen Glykopeptiden beschichtet waren, die eine oder mehrere Repeat-Einheiten von MUC1 mit einzelnen oder mehrfachen O-gebundenen Kern-Typ (core-type) Glykanen umfassen. Exogen verabreichte lösliche oder korpuskulär gebundene MUC1-Peptidfragmente wurden durch humane oder murine dendritische Zellen (DCs) rasch aufgenommen und ein großer Anteil wurde in den „späten“ endosomalen Kompartimenten während

30

vier Stunden prozessiert. Vom MUC1-Repeatpeptid stammende proteolytische Fragmente, die identifiziert und sequenziert wurden, zeigen, dass die Glykane während der Antigen-Prozessierung nicht entfernt werden, und dass das Vorhandensein der Kohlenhydrate die Spaltstellen beeinflusst, was ein unterschiedliches Repertoire an gespaltenen Peptiden zur Folge hat.

Überraschenderweise legen die Proteolyseprodukte eine hochspezifische Prozessierung des Repeatpeptides mit einer bevorzugten Spaltstelle an der Thr-Ser-Peptidbindung nahe. Während menschliches Cathepsin D nicht dazu in der Lage war, das MUC1-Repeatpeptid *in vitro* zu spalten, hatte eine Proteolyse mit menschlichem Cathepsin-L eine spezifische Hydrolyse der Thr-Ser-Peptidbindung zur Folge. Weil MUC1-Sequenzen in jeder Repeat-Einheit ein VTSA-Motiv enthalten, beginnen die erzeugten Fragmente an ihrem N-Terminus mit der Aminosäuresequenz SAP. Es hat sich weiterhin herausgestellt, dass Cathepsin L das MUC1-Repeatpeptid an einer weiteren Stelle spaltet, nämlich an His-Gly. Damit entstehen als Intermediärprodukte der Prozessierung GVT20-Fragmente (siehe z.B. SEQ ID NO: 12), die in Abhängigkeit von der ortsspezifischen O-Glykosylierung durch einen weiteren proteolytischen Schnitt in SAP17-Fragmente überführt werden.

Informationen über die Struktur prozessierter MUC1-Glykopeptide sind für die Entwicklung von Tumorstoffen von äußerster Wichtigkeit. Eine intakte O-Glykosylierung auf einem prozessierten MUC1-Repeatpeptid trägt zu einer größeren Vielfalt der MHC-Klasse-II-restringierten T-Helferzell-Reaktionen bei, wodurch eine allumfassende Antitumorreaktion gefördert wird.

Erfindungsgemäß wird ein MUC1-Peptidfragment der Tandem-Repeat-Domäne von humanem MUC1 bereitgestellt, das mit der Aminosäuresequenz SAP beginnt und zumindest neun Aminosäuren aufweist. Die Aminosäuresequenz von humanem MUC1 ist bereits bekannt und ist beispielsweise in der SWISS PROT-Datenbank zu finden. Das MUC1-Protein enthält wechselnde Anzahlen von Aminosäuren, was auf einen Längen-Polymorphismus zurückzuführen ist, der sich aus individuell variablen Repeat-Anzahlen ergibt, und es sind im Augenblick zumindest neun Isoformen bekannt (1/A, 2/B, 3/C, 4/D, 5/SEC, 6/X, 7/Y, 8/Z und 9/S, die durch alternatives Spleißen erzeugt werden).

In dieser Erfindung werden spezielle MUC1-Fragmente betrachtet, die aus einer synthetischen oder natürlichen MUC1-Sequenz stammen, und die enzymatisch am VTSA-Motiv gespalten wurden, das in allen MUC1-Sequenzen enthalten ist (oder im Falle von synthetischen Fragmenten chemisch synthetisiert wurde). Die Fragmente der vorliegenden Erfindung können somit durch Spaltung der MUC1-Sequenzen mit Cathepsin-L gewonnen werden. Ungeachtet der Start-Aminosäureposition in der Repeat-Sequenz (TAP, AHG, GST) und der Länge der Peptide (20mer, 21mer, 25mer, 100mer) spaltet Cathepsin-L im VTSA-Motiv des Repeat-Peptids spezifisch zwischen Thr-Ser und ergibt dadurch die erfindungsgemäßen Peptidfragmente. Es ist ein essentielles Merkmal der vorliegenden Erfindung, dass alle Fragmente an ihrem N-Terminus mit der Aminosäuresequenz SAP beginnen.

Wie oben erwähnt, ist das MUC1-Peptidfragment der vorliegenden Erfindung nicht in seiner Länge beschränkt und kann beispielsweise bis zu 100 Aminosäuren oder sogar mehr umfassen. Jedoch werden Aminosäuren bevorzugt, bei denen sich das MUC1-Fragment im Bereich von 10-25, beispielsweise 20, Aminosäuren bewegt. Da Cathepsin-L – wie oben angesprochen – weiterhin zu einer Proteolyse an His-Gly in der Lage ist, werden erfindungsgemäß insbesondere Peptidfragmente mit 17 Aminosäuren gebildet (d.h., das MUC1-Repeat-Peptid wird in einer Repeat-Einheit an 2 Stellen gespalten (nämlich Thr-Ser und His-Gly), wodurch sich ein Fragment aus 17 Aminosäuren ergibt, siehe auch Fig. 5).

Der Abbau bis auf das Niveau des SAP17 wird jedoch durch O-Glykosylierung an Thr oder Ser innerhalb des VTSA-Motivs inhibiert, so daß entsprechend glykosylierte GVT20-Fragmente als Endprodukte entstehen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung spezielle MUC1-Peptidfragmente bereit, die die Aminosäuren von SEQ ID NO: 1-4 oder 11 oder Varianten hiervon umfassen, wobei die Varianten ein oder mehrere Insertionen, Substitutionen und/oder Deletionen im Vergleich zur Sequenz von SEQ ID NO: 1-4 oder 11 umfassen, und wobei die biologische Aktivität der Varianten im Wesentlichen der Aktivität des Peptids gleich ist, das die nicht-modifizierte Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1-4 oder 11 umfasst, und vorausgesetzt, dass die Varianten mit der Aminosäuresequenz SAP beginnen und zumindest neun Aminosäuren umfassen.

In diesem Kontext stellt die vorliegende Erfindung die nachfolgenden Peptide bereit:

SAPDTRPAPGSTAPPAHGV **T** (SEQ ID NO: 1)
←
5 SAPE **S**RPAPGSTAPAAHGV **T** (SEQ ID NO: 2)
←
SAPE **S**RPAPGSTAPPAHGV **T** (SEQ ID NO: 3)
←
10 SAPDTRPAPGSTAPAAHGV **T** (SEQ ID NO: 4)
←
SAPDTRPAPGSTAPPAH **H** (SEQ ID NO: 11)
←

Der Pfeil weist darauf hin, dass die vorliegende Erfindung auch Varianten der oben erwähnten Aminosäuresequenzen einschließt, die um ein oder mehrere Aminosäuren, ausgehend vom C-Terminus, reduziert sind, unter dem Vorbehalt, dass die Varianten zumindest die neun N-terminalen Aminosäuren der oben angezeigten Sequenzen umfassen (fett gedruckt).

Der Begriff "biologische Aktivität", wie hierin verwendet, betrifft die immunogene Funktion der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen. Wie oben erwähnt, wird MUC1 natürlich in verschiedenen Krebsarten, wie Brustkrebs oder Adenokarzinomen, überexprimiert und ist deswegen ein bedeutendes Target bzw. Ziel für die Immun-basierte anti-Krebstherapie. Somit werden die wie hierin vorstehend offenbarten MUC1-Fragmente in einem solchem Umfang betrachtet, in dem sie zur Induktion einer Immunreaktion in Säugetieren, vorzugsweise Menschen, in der Lage sind, um einen Angriff des Patienten-eigenen Immunsystems gegen den jeweiligen Krebs zu initiieren/zu fördern.

Die Aminosäuresequenzen der vorliegenden Erfindung umfassen ebenfalls alle Sequenzen, die sich von den hierin offenbarten Sequenzen durch Aminosäureinsertionen, -deletionen und -substitutionen unterscheiden.

Aminosäure-„Substitutionen“ sind vorzugsweise das Ergebnis des Ersetzens einer Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlichen strukturellen und/oder chemischen Eigenschaften, das heißt konservative Aminosäure-Ersetzungen. Aminosäure-Substitutionen können auf der Grundlage einer Ähnlichkeit in der Polarität, Ladung, Löslichkeit, Hydrophobie,

Hydrophilie und/oder der amphipatischen Natur der einbezogenen Reste vorgenommen werden. Beispielsweise schließen unpolare (hydrophobe) Aminosäuren Alanin, Leucin, Isoleucin, Valin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan und Methionin ein; polare neutrale Aminosäuren schließen Glycin, Serin, Threonin, Cystein, Tyrosin, Asparagin und Glutamin ein; positiv
5 geladene (basische) Aminosäuren schließen Arginin, Lysin und Histidin ein; und negativ geladene (saure) Aminosäuren schließen Asparaginsäure und Glutaminsäure ein.

"Insertionen" oder "Deletionen" bewegen sich typischerweise im Bereich von 1-3 Aminosäuren. Die erlaubte Variation kann experimentell bestimmt werden, indem systematisch Inserti-
10 onen, Deletionen oder Substitutionen von Aminosäuren in einem Polypeptidmolekül unter Verwendung von DNA-Rekombinationstechniken vorgenommen und die sich ergebenden rekombinanten Varianten bezüglich ihrer Aktivität untersucht werden. Dazu ist für den Fachmann nicht mehr als die Durchführung von Routineexperimenten erforderlich. Im Falle der MUC1-Repeats sind drei Positionen bekannt, die einen Sequenzpolymorphismus in der
15 Population zeigen (Engelmann et al., 2001, J. Biol. Chem. 276: 27764-27769; PCT Patentanmeldung PCT/DE00/00440, deren Offenbarung durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit in diese Anmeldung mit aufgenommen ist).

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin eine Nukleinsäure, die eine der oben erwähnten
20 MUC1-Peptidfragmente kodiert.

Der Begriff "Nukleinsäuresequenz" betrifft ein Heteropolymer aus Nukleotiden oder die Sequenz dieser Nukleotide. Die Begriffe "Nukleinsäure" und "Polynukleotid" werden hierin austauschbar verwendet und beziehen sich auf ein Heteropolymer von Nukleotiden.

25 Die Polynukleotide der vorliegenden Erfindung schließen ebenfalls ein, sind jedoch nicht beschränkt auf, ein Polynukleotid, das an das Komplement der offenbarten Nukleotidsequenzen unter moderat stringenten oder stringenten Bedingungen hybridisiert; ein Polynukleotid, das eine Allel-Variante irgendeines oben beschriebenen Polynukleotids ist; ein Polynukleotid,
30 das ein Spezies-Homolog irgendwelcher der hierin offenbarten Proteine kodiert; oder ein Polynukleotid, das ein Polypeptid kodiert, das eine zusätzliche spezifische Domäne oder eine Trunkierung bzw. Verkürzung der offenbarten Proteine aufweist.

Die Stringenz der Hybridisierung, wie hierin verwendet, betrifft Bedingungen, unter denen Polynukleotid-Doppelstränge stabil sind. Wie dem Fachmann bekannt ist, ist die Stabilität eines Doppelstranges eine Funktion der Natriumionenkonzentration und der Temperatur (siehe beispielsweise Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, (1989))). Die Stringenzniveaus, die zur Hybridisierung verwendet werden, können vom Fachmann leicht abgewandelt werden.

Der Begriff schwach stringente Hybridisierung bezeichnet Bedingungen, die einer Hybridisierung in 10% Formamid, 5 x Denharts Lösung, 6 x SSPE, 0,2% SDS bei 42°C, gefolgt von Waschen in 1 x SSPE, 0,2% SDS bei 50°C äquivalent sind. Denhart's Lösung und SSPE sind dem Fachmann genauso wie andere geeignete Hybridisierungspuffer wohl bekannt.

Eine moderat stringente Hybridisierung bedeutet Bedingungen, die es der DNA erlauben, an eine komplementäre Nukleinsäure zu binden, die ungefähr 60% Identität, vorzugsweise ungefähr 75% Identität, besonders bevorzugt ungefähr 85% Identität zu dieser DNA aufweist; wobei eine Identität von mehr als ungefähr 90% zu dieser DNA besonders bevorzugt wird. Moderat stringente Bedingungen sind vorzugsweise Bedingungen, die eine Hybridisierung in 50% Formamid, 5 x Denharts Lösung, 5 x SSPE, 0,2% SDS bei 42°C gefolgt von Waschen in 0,2 x SSPE, 0,2% SDS bei 65°C äquivalent sind.

Hochstringente Hybridisierung bedeutet Bedingungen, die die Hybridisierung nur von solchen Nukleinsäuresequenzen ermöglichen, die in 0,018 M NaCl bei 65°C stabile Doppelstränge bilden (d.h., wenn ein Doppelstrang in 0,018 M NaCl bei 65°C nicht stabil ist, ist er unter den hierin betrachteten hochstringenten Bedingungen nicht stabil).

Weiterhin können Nukleinsäure-Hybridisierungstechniken verwendet werden, um eine Nukleinsäure zu identifizieren und zu gewinnen, die im Umfang der vorliegenden Erfindung liegt. Kurz gesagt kann jede Nukleinsäure mit einer gewissen Homologie zu einer in dieser Erfindung dargelegten Sequenz oder einem Fragment hiervon, als Sonde zur Identifizierung einer ähnlichen Nukleinsäure durch Hybridisierung unter moderat stringenten bis hochstringenten Bedingungen verwendet werden. Solche ähnlichen Nukleinsäuren können dann isoliert, sequenziert und analysiert werden, um zu bestimmen, ob sie im Umfang der wie hierin beschriebenen Erfindung liegen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind die MUC1-Peptidfragmente der vorliegenden Erfindung an einem oder mehreren der Threonine oder Serine, die in der Sequenz enthalten sind, O-glykosyliert. Vorzugsweise sind die MUC1-Peptidfragmente einer der SEQ ID
5 NO: 1-4 oder 11 an Thr 5 und/oder 12 glykosyliert. Jedoch können auch alle anderen Serine oder Threonine glykosyliert sein. Ein bevorzugtes Glykan, das hierin verwendet wird, ist ein oder mehrere komplexe Glykane, die davon abgeleitet sind.

Gemäß eines weiteren Aspektes stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen MUC1-Peptidfragmente bereit, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

10

- a) Bereitstellen eines Peptids, das die Tandem-Repeat-Domäne von MUC1 oder einen Teil hiervon umfasst, wobei der Teil zumindest eine Repeating-Unit bzw. Wiederholungseinheit der Tandem-Repeat-Domäne von MUC1 enthält,
15
- b) In-Berührung-Bringen des Peptids aus a) mit einer wirksamen Menge Cathepsin-L, wodurch das Peptid gespalten wird, und
- 20 c) Isolieren der in b) erzeugten Fragmente.

Das in a) bereitgestellte Peptid ist vorzugsweise ein MUC1-Protein, das ein natürliches Glykosylierungsmuster aufweist. Wie oben erwähnt, wurde durch den Erfinder überraschenderweise herausgefunden, dass eine wie in Schritt b) durchgeführte Cathepsin-L-Spaltung das
25 Glykosylierungsmuster des in a) bereitgestellten MUC1-Proteins unversehrt bzw. intakt lässt. Eine intakte O-Glykosylierung auf prozessierten MUC1-Repeat-Peptiden wiederum trägt zu einer größeren Vielzahl der MHC-Klasse-II-restringierten T-Helferzell-Reaktionen bei, wodurch die Gesamt-Antitumorreaktionen der Patienten erhöht wird. Somit führt das erfindungsgemäße Verfahren zu einem MUC1-Peptidfragment, das leicht durch die APCs des Patienten, beispielsweise durch dendritische Zellen, auf dem MHC-Klasse-II-Weg prozessiert werden kann und mit einem intakten Glykosylierungsmuster präsentiert wird, was zu einer erhöhten Immunreaktion von T-Helferzellen führt. Es sollte in diesem Kontext erwähnt werden, dass bezüglich des Glykosylierungsmusters keine Einschränkung besteht, jedoch führt
30

ein Threonin, das an der Spaltstelle glykosyliert ist, zu einer Thr-Ser-Bindung, die gegenüber einer Cathepsin-L-Proteolyse stabil ist. Glykosylierungen an anderen Stellen stören die erfindungsgemäße Spaltung durch Cathepsin-L nicht, jedoch kann eine vielfache Gal-GalNAc-Substitution sowie eine Substitution mit komplexen Glykanen eine Fragmentierung an His-Gly erschweren oder sogar verhindern.

Selbstverständlich ist das oben erwähnte-Verfahren nicht das einzige Verfahren, das zu den erfindungsgemäßen Peptidfragmenten führt, gleichgültig, ob sie glykosyliert sind oder nicht. Es ist ebenfalls möglich, diese Fragmente chemisch zu synthetisieren, indem beispielsweise ein erwünschtes Glykosylierungsmuster bereitgestellt wird. Zur Synthese von Glykopeptiden sind Glykosylaminosäure-Bausteine erforderlich, die bereits die Oligosaccharid-Kette und Threonin oder Serin enthalten. Die Synthese dieser Bausteine wurde bereits beschrieben

(Mathieux, N., Paulsen, H., Meldal, M., Bock, K., J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: 2359-2368, 1997). Die Mehrfachsäulen-Festphasensynthese kann in einem halbmanuellen 20-

Säulen-Mehrfachsynthesegerät durchgeführt werden und ein Wang-Harz kann als Trägermaterial ausgewählt werden. Das Wang-Harz (2,5 g) kann beispielsweise in einem Glasreaktor angeordnet, in Dichlormethan (15 cm³, 10 Min.) gequollen und gewaschen werden. Ein Gemisch von Fmoc-Ala-OH (3,40 mmol), 1-(Mesitylensulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazol (3,40 mmol) und Methylimidazol (3,40 mmol) in Dichlormethan (15 cm³) wurde zugesetzt. Nach 20 Stunden wurde das Harz gewaschen und die unveränderten Aminogruppen können mit Ac₂O/DMF (1:1; 15 cm³) acetyliert werden. Das derivatisierte Harz wird dann für die Glykopeptidsynthese in die 20 Säulen des Synthesegerätes gepackt. Das Reaktions- und Waschlösungsmittel kann DMF sein und die Beseitigung des Fmoc-Schutzes wurde durch Behandlung

mit Piperidin (20 %) in DMF (20 Min.) durchgeführt. Die Aminosäuren werden als Fmoc-

Aminosäure-Pfp-Ester mit Dhbt-OH (3 Moläquiv.) gebunden. Die Gal (1→3) GalNAc-enthaltenden Bausteine werden mit TBTU und N-Ethyl-diisopropylamin (1,5 Moläquiv.) gebunden. Nach 20 Stunden Umsetzungszeit wird der Syntheszyklus wiederholt, um den Aufbau jedes Glykopeptids abzuschließen. Nach Entfernung der letzten Fmoc-Gruppen werden die Harze gewaschen, getrocknet, mit 95 % wässrigem TFA (2 cm³, 2 Stunden) behandelt und abfiltriert. Darauf werden die Verbindungen mit katalytischen Mengen 1 % CH₃ONa in Methanol bei pH 8,5 behandelt, um die Acetylgruppen des Saccharid-Anteils zu entfernen und werden durch eine präparative RP-HPLC gereinigt. Die reinen O-Glykopeptide werden nach Lyophilisation in Ausbeuten von 16-57 % gewonnen.

Es werden vorzugsweise Glykopeptide gebildet, die an einem oder mehreren der Threonin- oder Serinreste O-gebundenes GalNAc oder längere komplexe Glykane enthalten.

- 5 Das in Schritt a) bereitgestellte Peptid wird vorzugsweise durch natürliches MUC1 repräsentiert, das aus humanen MilCHFettmembranen (s. Müller et al., 1997, J. Biol. Chem. 272: 24780-24793), aus Tumor-Aszites (Beatty, et al., 2001, Clin. Cancer Res. 7, 781-787) oder aus humanen Brustkarzinom-Zelllinien (Müller et al., 2002 J. Biol. Chem. 277: 26103-26112) gewonnen wird oder wird durch SEQ ID NO: 5, 6, 9 oder 10 oder 12 dargestellt.

10

- Darüber hinaus sind die erfindungsgemäßen Aminosäuren des in Schritt a) bereitgestellten Peptids des oben erwähnten Verfahrens zur Herstellung der erfindungsgemäßen MUC1-Peptidfragmente O-glykosyliert, jedoch vorausgesetzt, dass das Peptid nicht an der Spaltstelle von Cathepsin-L glykosyliert ist. Vorzugsweise sind ein oder mehrere Threonine oder Serine
15 des erfindungsgemäßen Peptidfragmentes, das in c) isoliert wird, O-glykosyliert.

Gemäß eines weiteren Aspektes wird ein MUC1-Peptidfragment bereitgestellt, das durch die oben erwähnten Verfahren gewinnbar ist.

- 20 Die Erfindung ist weiterhin auf ein *ex vivo*-Verfahren zur Herstellung einer Population autologer Antigen präsentierender Zellen (APCs) gerichtet, die zur Induktion einer wirksamen Immunreaktion gegen MUC1 in der Lage ist, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- 25 a) In-Berührung-Bringen der autologen APCs von Tumorpacienten mit einer wirksamen Menge eines erfindungsgemäßen MUC1-Peptidfragmentes unter Bedingungen, die eine Endozytose, Prozessierung und MHC-Klasse-II-Präsentation der Peptidfragmente durch die APCs ermöglichen, und
- 30 b) Isolieren der MUC1-Peptid-präsentierenden APCs zum Zweck einer immuntherapeutischen Anwendung in Patienten.

Vorzugsweise werden die MUC1-Peptidfragmente in a) an beschichtete Eisenoxid-Kügelchen gebunden. Es sei jedoch erwähnt, dass alle anderen bekannten Kügelchen bzw. Beads im oben erwähnten Verfahren zu diesem Zweck verwendet werden können. Im Allgemeinen können alle Kügelchen verwendet werden, die nicht größer als ungefähr 1-2 μm sind und eine kovalente Bindung von Antikörpern und Lektinen erlauben.

Darüber hinaus wird ein *ex vivo*-Verfahren zur Herstellung gentechnisch erzeugter APCs bereitgestellt, die zum Induzieren einer wirksamen Immunreaktion gegen MUC1 in der Lage sind, und das die nachfolgenden Schritte umfasst:

- a) Bereitstellen einer Nukleinsäure, die für eines der erfindungsgemäßen MUC1-Peptidfragmente kodiert;
- b) Transfizieren der APCs mit dieser Nukleinsäure, und
- c) Auswählen von APCs, die die MUC1-Peptidfragmente in einer MHC-II-restringierten Weise präsentieren.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird die Nukleinsäure in Schritt a) in einem Expressionsvektor bereitgestellt. Dieser Expressionsvektor umfasst vorzugsweise ein oder mehrere Regulationssequenzen. Der Begriff "Expressionsvektor" betrifft im Allgemeinen ein Plasmid oder einen Phagen oder ein Virus oder einen Vektor zum Exprimieren eines Polypeptids aus einer DNA (RNA) Sequenz. Ein Expressionsvektor kann eine Transkriptionseinheit umfassen, die eine Anordnung des Folgenden aufweist: (1) ein genetisches Element oder Elemente mit einer regulatorischen Rolle in der Genexpression, beispielsweise Promotoren oder Enhancer, (2) eine Struktursequenz oder kodierende Sequenz, die in mRNA transkribiert und in ein Protein translatiert wird und (3) geeignete Transkriptionsstart- und -terminationssequenzen. Struktureinheiten, die zur Verwendung in Hefen oder eukaryontischen Expressionssystemen vorgesehen sind, schließen vorzugsweise eine Leadersequenz ein, die die extrazelluläre Sekretion eines translatierten Proteins durch einen Wirt ermöglicht. Es kann alternativ, wenn ein rekombinantes Protein ohne eine Leader- oder Transportsequenz exprimiert wird, einen N-terminalen Methionin-Rest einschließen. Dieser Rest kann oder

kann nicht anschließend von dem exprimierten rekombinanten Protein abgespalten werden, um das Endprodukt bereitzustellen.

5 Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine APC bereitgestellt, die durch eines der vorher erwähnten Verfahren gewinnbar ist. Vorzugsweise ist diese APC eine dendritische Zelle oder eine B-Zelle.

10 Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin eine therapeutische Zusammensetzung bereit, die das erfindungsgemäße MUC1-Peptidfragment oder die erfindungsgemäßen APCs und einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst. Eine solche Zusammensetzung kann weiterhin (zusätzlich zum Inhaltsstoff und dem Träger) Verdünnungsmittel, Füllmittel, Salze, Puffer, Stabilisatoren, Lösungsvermittler und andere Materialien enthalten, die in der Technik wohl bekannt sind. Der Begriff "pharmazeutisch verträglich" bedeutet ein untoxisches Material, das die Wirksamkeit der biologischen Aktivität des aktiven Inhaltsstoff (der aktiven Inhaltsstoffe) nicht stört. Die Eigenschaften des Trägers hängen vom Verabreichungsweg ab. Die therapeutische Zusammensetzung kann weiterhin weitere Mittel bzw. Wirkstoffe enthalten, die die Aktivität bzw. Wirksamkeit oder Anwendung bei Behandlung verbessern bzw. erleichtern. Solche zusätzlichen Faktoren und/oder Mittel können in der therapeutischen Zusammensetzung enthalten sein, um eine synergistische Wirkung zu erzeugen oder um Nebenwirkungen zu minimieren.

15
20

Techniken zur Formulierung bzw. Zubereitung und Verabreichung der Verbindungen der vorliegenden Erfindung sind in "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, neueste Ausgabe, zu finden.

25

30 Die Zusammensetzungen enthalten eine therapeutisch wirksame Dosis des jeweiligen Inhaltsstoffes. Eine therapeutisch wirksame Dosis betrifft diejenige Menge der Verbindung, die ausreicht, um eine Linderung der Symptome, beispielsweise eine Behandlung, Heilung, Prävention oder Linderung derartiger Zustände, insbesondere die Induktion einer Immunreaktion in einem Patienten zu ergeben. Geeignete Verabreichungswege schließen beispielsweise eine parenterale Verabreichung, einschließlich intramuskulärer und subkutaner Injektionen, ebenso wie intrathekaler, direkt intraventrikulärer, intravenöser, intraperitonealer Injektionen ein. Die intravenöse Verabreichung an den Patienten wird bevorzugt.

Eine typische Zusammensetzung für eine intravenöse Infusion kann so hergestellt werden, dass sie bis zu 250 ml sterile Ringer'sche Lösung und 10 mg Inhaltsstoff enthält. Siehe Remington's Pharmaceutical Science (15. Ausgabe, Mack Publishing Company, Easton, Ps., 1980). Die therapeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung ist vorzugsweise eine Vakzine.

Wie oben erwähnt, findet diese Vakzine Anwendung zur Verwendung in der Behandlung von Brustkrebs und anderen MUC1-positiven Karzinomen, einschließlich kolorektalen Karzinomen, Pankreas- und Magenkarzinomen.

Soweit keine anderen Definitionen angegeben sind, weisen alle technischen und wissenschaftlichen Begriffe, die hierin verwendet werden, dieselbe Bedeutung auf, wie sie üblicherweise vom Fachmann auf dem Gebiet, an den sich diese Erfindung wendet, verstanden werden. Alle Veröffentlichungen, Patentanmeldungen, Patente und anderen hierin erwähnten Referenzen sind durch Bezugnahme in ihrer Gesamtheit mit aufgenommen. Im Falle eines Konfliktes wird jedoch die vorliegende Beschreibung einschließlich der Definitionen entscheiden. Zusätzlich sind die Materialien, Methoden und Beispiele lediglich veranschaulichend und sollen nicht als einschränkend aufgefasst werden.

Die Erfindung wird nunmehr durch die begleitenden Zeichnungen veranschaulicht, die das Folgende darstellen:

Fig. 1

MUC1-Glykopeptid-Prozessierung durch murine dendritische Zellen

Ein Gemisch aus biotinylierten Glykopeptiden H1 bis H3 (AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA; SEQ ID NO: 5) und H4 bis H6 (AHGVTSAPESRPAPGSTAPAA; SEQ ID NO: 6), die einer Teilsequenz von MUC1-Tandem-Repeats entsprachen und die an Thr5 (H1, H4), Thr10/Ser10 (H2, H5) oder Thr17 (H3, H6) mit GalNAc glykosyliert waren, wurden zum Pulsen von murinen dendritischen Zellen D2.4 verwendet. Die Prozessierungsprodukte wurden aus Zellfraktionen Affinitäts-isoliert oder aus Kulturüberständen isoliert, mit Dithiotreitol

reduziert, so dass die Markierung abgespalten wurde und wurde durch Reflectron-MALDI-Massen-Spektrometrie im positiven Ionen-Modus (positive ion mode) analysiert.

A, zentrifugierte Zellfraktion;

5 B, magnetisch getrennte Zellfraktion;

C, Kulturüberstand

Die Hauptsignale bei m/z 2249,0 (H1 bis H3) und 2223,0 (H4 bis H6) entsprechen den Vorläufer-Glykopeptiden, die Signale bei m/z 1695,7 (P1) und 1669,7 (P2) entsprechen den
10 SAP16-Fragmenten (P1 abgeleitet von H1 bis H3; P2 von H4 bis H6).

Fig. 2

Peptid-Sequenzierung der Prozessierungsprodukte P1 und P2 durch LC-MS/MS-Analyse auf einem Qtof2-Elektrospray-Massenspektrometer

15

(Glyko)peptide wurden durch eine Nanoflow-Flüssigchromatographie auf einer Umkehrphasen-Mikrokapillarsäule aufgetrennt und online durch Elektrospray-Massen-Spektrometrie im positiven Ionen-Modus untersucht. B-Ion- und Y-Ion-Fragmentreihen aus den N-terminalen und C-terminalen Sequenzen der Hauptpeptidprodukte (A, P1 bei m/z 1695; B, P2 bei m/z
20 1669) wurden dazu verwendet, die Sequenz der SAP16-Peptide zu bestätigen (Bezugnahme auf C).

Fig. 3

***In vitro*-Proteolyse von MUC1-Glykopeptiden durch humanes Cathepsin-L**

25

MUC1-Glykopeptide (10 μ g) wurden 3 Stunden mit 2-5 munits Cathepsin-L in 0,1 M Natriumacetat, pH 5,5 behandelt, das 1 mM EDTA und 1 mM DTT enthielt. Reflectron-MALDI-Massenspektren wurden im positiven Ionen-Modus unter Verwendung von α -Cyano-4-hydroxy-cinnamonsäure als Matrix aufgezeichnet.

30

A, Biotinyliertes A3-Glykopeptid (m/z 2784,7), A3-Glykopeptid nach reduktiver Spaltung der Markierung (m/z 2412,6), SAP16-Fragment (m/z 1858, 3).

B, Produkte des nicht-markierten A3-Glykopeptids: SAP16-Fragment (m/z 1858,0), APD15 (m/z 1771,0), TSA17 (m/z 1959,0).

Fig. 4

5 **Cathepsin-L-artige Aktivität in Endosomen niederer Dichte aus murinen dendritischen Zellen spaltet MUC1-Repeats bei Thr-Ser**

Endosomen mit niederer Dichte (low-density endosomes) in murinen dendritischen Zellen wurden aus Lysosomen und Plasmamembranen durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation in
10 Percoll/Saccharose (30 ml) aufgetrennt. Fraktionen (1 ml) wurden auf das Vorhandensein von Markerproteinen/-enzymen (β -Hexosaminidase, H2-Antigen) und bezüglich ihrer proteolytischen Aktivität getestet. Das TAP25-Peptid wurde als Substrat verwendet (20 Stunden, 37 °C, pH 5,5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT).

15 Fig. 5

Cathepsin L-vermittelte Proteolyse von MUC1-Repeatpeptiden

In der Figur bezeichnet ↓ eine Spaltstelle von Cathepsin-L. ◇ bedeutet eine Glykosylierungsstelle.

20

Materialien und Methoden

Isolierung und Kultivierung dendritischer Zellen

25 Immortalisierte dendritische Zellen (Klon D2.4) von C57BL/6-Mäusen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM gezüchtet, ergänzt mit 10 % FCS, L-Glutamin, 0,1 % 2-Mercaptoethanol und Antibiotika (9).

Erzeugung synthetischer (biotinylierter) MUC1-Glykopeptide und deren Bindung an magne-
30 tische Eisenoxiddügelchen

Die Glykopeptide H1 bis H6, die den MUC1-Tandem-Repeat-Peptiden auf Grundlage der AHG21-Sequenzen AHGVT SAPDTRPAPGSTAPPA (H1 bis H3) und AHGVT SAPESR-PAPGSTAPAA (H4 bis H6) entsprachen und die GalNAc an Thr5, Thr10 oder Thr17 trugen, wurden gemäß früher veröffentlichter Vorschriften (10) chemisch synthetisiert und schrittweise auf präparativen und analytischen Umkehrphasensäulen an einem HPLC-Arbeitsplatz (System Gold, Beckman, München, Deutschland) isoliert. Dasselbe betrifft die Glykopeptid-Reihen H11 bis H13 (GalNAc-substituiert) und A3 (substituiert mit Gal β 1-3GalNAc an Thr17), die auf derselben Peptidsequenz wie H1 bis H3 basieren. Das 100mer-Peptid, das fünf Repeats der MUC1-Domäne entspricht und das mit dem HGV-Motiv beginnt, wurde durch eine lokale Einrichtung (University of Pittsburgh) synthetisiert und *in vitro* mit GalNAc unter Verwendung von gereinigtem Polypeptid-GalNAc-Transferasen-T1 und -T2 (freundlicherweise von Herrn Dr. Hendrik Clausen, School of Dentistry, University of Copenhagen, Dänemark, zur Verfügung gestellt) unter den früher beschriebenen Bedingungen (11, 12) glykosyliert.

15

Die Glykopeptide H1 bis H6 (jeweils 100 μ g) wurden mit [2-(Biotinamido)ethylamido]-3,3'-dithiopropionsäure-N-hydroxysuccinimidester (100 mM in DMSO, 100 μ l) bei 50 °C über eine Zeitspanne von 48 Stunden biotinyliert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels durch Vakuumzentrifugation wurden die biotinylierten Produkte von nicht markierten Glykopeptiden und von überschüssigem Reagenz durch Umkehrphasen-Chromatographie auf einer PLRP-Säule abgetrennt.

Anti-MUC1-Dynabeads wurden durch kovalente Bindung von 50 μ g monoklonalem B27.29-Antikörper an tosylierte M-280-Kügelchen (Dyna, Hamburg, Deutschland) in 0,1 M Boratpuffer, pH 9,5 (200 μ l) 48 Stunden lang bei Umgebungstemperatur hergestellt. Lektin-beschichtete Dynabeads wurden in ähnlicher Weise durch Bindung von 50 μ g Helix pomatia Agglutinin an M-280-Kügelchen hergestellt. Antikörper- und Lektin-beschichtete Kügelchen (10^8) wurden mit (biotinylierten) Glykopeptiden (50 μ g) durch Inkubation in 250 μ l AIMV-Medium unter Rollen für 2 Stunden bei Umgebungstemperatur komplexiert.

30

Antigen-Puls dendritischer Zellen und Isolierung von Peptidfragmenten

Murine dendritische D2.4 Zellen (10^7 Zellen/ml) wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen übertragen, in AIMV-Medium suspendiert und 1 Stunde bei 37 °C (5 % CO₂) vorinkubiert. Antigene wurden als Gemisch biotinylierter Glykopeptide H1 bis H6 (50 µg) nach Bindung bzw. Konjugation an anti-MUC1-Antikörper- und Lektin-(HPA-)beschichtete Dynabeads (jeweils zu 5×10^7 Kügelchen/ml Endkonzentration) zugesetzt. Die 1 ml-Suspension wurde unter gelegentlichem Schütteln bei 37 °C (5 % CO₂) für eine Gesamtzeitspanne von 4 Stunden inkubiert. Nach Pulsen wurden die Zellen aus dem Medium auf zwei Wegen abgetrennt: eine orthogonale magnetische Trennung von Kügelchen-beladenen Zellen und freien Dynabeads und eine Zentrifugation der verbleibenden Zellen (180 g, 5 Min.), die im ersten Schritt aufgrund einer geringeren Antigen/Kügelchen-Beladung nicht entfernt wurden. Beide Zellfraktionen wurden mehrmals in Phosphat (4 mM), NaCl (153 mM), pH 7,2 gewaschen, während der zellfreie Überstand bei 3000 g (5 Min., 4 °C) zentrifugiert wurde. Die Zellfraktionen wurden auf Eis 15 Minuten lang mit 100 µl 1 % NP40, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0, enthaltend ein Gemisch von Protease-Inhibitoren (Sigma P8340, München, Deutschland), gefolgt von Ultraschallung für 2 Minuten behandelt.

In Experimenten, in denen biotinylierte Antigene verwendet wurden, wurden die Zellextrakte zweifach mit PBS verdünnt und mit 2×10^8 Streptavidin-beschichteten Dynabeads M-270 für 30 Minuten bei 37 °C und für eine weitere 30-minütige Zeitspanne unter Rollen bei Umgebungstemperatur inkubiert. Nach magnetischer Trennung und dreimaligem Waschen der Kügelchen wurden die biotinylierten Glykopeptide durch Reduktion mit 10 mM Dithiotreitol bei 56 °C (30 Minuten) abgespalten, durch Vakuumzentrifugation getrocknet und in 0,1 % wässrige Trifluoressigsäure aufgenommen. Weil beide Zellfraktionen beträchtliche Anteile Antikörper- und Lektin-beschichteter Perlen enthielten, wurden auch nicht markierte Peptid- und Glykopeptid-Fragmente während dieses Trennschrittes isoliert. Es zeigte sich, dass beträchtliche Mengen des nicht markierten MUC1-Glykopeptids an Streptavidin-beschichtete Dynabeads über undefinierte Mechanismen banden, und dass sie während Erhitzen bzw. Erwärmen unter reduzierenden Bedingungen eluieren. Peptide und Glykopeptide, die im zellfreien Überstand enthalten waren, wurden durch Verwendung von Gemischen von Streptavidin-, anti-MUC1-Antikörper- und Lektin-beschichteten Kügelchen oder durch Anwendung einer Umkehrphasen-Chromatographie auf 50-µl-Säulen Poros C18 isoliert. Nach Zuführung von 500 µl Überstand an die Umkehrphasensäule wurde die Probe entsalzt, indem sie mit 0,1 % wäss-

riger Trifluoressigsäure gewaschen und mit 80 % Acetonitril in 0,1 % wässriger Trifluoressigsäure eluiert wurde.

Massenspektrometrische Analysen

5

MALDI-Massenspektrometrie: Die Peptid- und Glykopeptid-Proben (20 µl), die in 0,1 % wässriger Trifluoressigsäure oder in Gemischen mit Acetonitril enthalten waren, wurden auf einen Probenteller aus rostfreiem Stahl durch Mischen einer 1 µl-Teilmenge mit demselben Volumen an Matrix (gesättigte Lösung von α -Cyano-4-hydroxy-cinnamonsäure in Acetonitril/0,1 % TFA, 2:1) aufgebracht. Eine massenspektrometrische Untersuchung wurde auf
10 einem Bruker-Reflex IV Gerät (Bruker-Daltonics, Bremen, Deutschland) durch positiven Ionen-Nachweis im Reflectron-Modus durchgeführt. Eine Ionisierung der kokristallisierten Analyten wurde mit einem gepulsten Stickstoff-Laserstrahl (337 nm) induziert und die Ionen wurden in einem Feld von 20 kV beschleunigt und reflektierten bei 23 kV (12, 13).

15

Nanoflow-Flüssigkeitschromatographie mit online ESI-Massenspektrometrie: LC/MS-Daten wurden auf einem Q-ToF II Quadrupole-Time of Flight-Massenspektrometer (Micromass, Manchester, UK) gewonnen, das mit einer Z-Spray-Quelle ausgestattet war. Die Proben wurden unter Verwendung des Ultimate-nano-LC-Systems (LC Packings, Amsterdam, Niederlande) eingebracht, das mit dem Famos-Autosampler und dem Switchos-Säulenumschaltmodul (column switching module) ausgerüstet war. Der Säulenaufbau umfasste eine 0,3 mm x 1 mm Trap-Säule und eine 0,075 x 150 mm Analysensäule, beide mit 3 µm PepMap C18 (LC Packings, Amsterdam, Niederlande) bepackt. Die Proben wurden 1:10 in 0,1 % TFA verdünnt. 10 µl wurden auf die Trap-Säule injiziert und 3 Minuten unter Ver-
25 wendung von 0,1 % TFA und einer Durchflussgeschwindigkeit von 30 µl/Min. entsalzt. Das Eingangsventil 10 schaltete die Trap-Säule zum analytischen Durchflussweg um und die Peptide wurden auf der Analysensäule unter Verwendung eines Gradienten aus 5 % ACN in 0,1 % Ameisensäure zu 40 % ACN in Ameisensäure über 20 Minuten und einer Säulendurchflussgeschwindigkeit von ungefähr 200 nl/min. eluiert, was eine 1:1000-Aufteilung des 200
30 µl/min.-Durchflusses ergab, der durch die Pumpe erbracht wurde. Das ESI-Interface umfasste einen Metall-beschichteten PicoTip-Sprayemitter (New Objective, MA), befestigt an der PicoTip-Halteranordnung (New Objective). Stabiles Nanospray wurde durch Aufbringung von 2,5-3,0 kV auf das distale Ende des PicoTips und durch eine Stickstoff-

Gegenstromgeschwindigkeit von ungefähr 40 l/min. aufgebaut. Die Daten-abhängige Erfassung der MS- und MS/MS-Spektren wurde durch die Masslynx-Software kontrolliert. Überwachungs-Scans von einer Sekunde deckten den Bereich von m/z 400 bis m/z 1200 ab. Doppelt und dreifach geladene Ionen, die eine vorgegebene Schwelle überschritten, wurden für MS/MS-Experimente ausgewählt. Im MS/MS-Modus wurde der Massenbereich von m/z 40 bis m/z 1400 in einer Sekunde gescannt und 10 Scans ergaben sich für jedes Experiment. Micromassen-formatierte Peak-Listen wurden aus den Rohdaten unter Verwendung des Proteinlynx-Softwaremoduls erzeugt.

10 Konfokale Lasermikroskopie und Fluoreszenz-aktiviertes Zellsortieren

Die Antigen-Aufnahme wurde durch durchflusszytometrische Analysen unter Verwendung eines Becton Dickinson FACScalibur gemäß einer kürzlich veröffentlichten Vorschrift (14) mengenmäßig erfasst. Vor der mikroskopischen Inspektion wurden die DCs mit 2 % Formaldehyd fixiert und mit 0,1 % Saponin permeabilisiert. Im Anschluss an eine Färbung mit anti-MUC1-Antikörpern (B27.29, Biomira, Edmonton, Kanada), biotinyliertem sekundärem anti-Maus-Ig (Dako, Hamburg, Deutschland) und FITC-markiertem Streptavidin (Sigma), wurden die Zellen ein zweites Mal mit 1 % Paraformaldehyd fixiert, die Kammern der Objektträger entfernt und die Objektträger zur Untersuchung durch konfokale Lasermikroskopie auf einer Leica DM IRE2 (14) befestigt.

In vitro-Proteolyse von MUC1 (Glyko)peptiden mit menschlichen Cathepsinen und endosomal Fraktionen mit niedriger Dichte aus murinen dendritischen Zellen

Humanes Cathepsin-L und -D wurden von Sigma (München, Deutschland) bezogen und in 0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 5,5 solubilisiert, der 1 mM EDTA (Cathepsin-D) und 1 mM Dithiothritol (Cathepsin-L) enthielt. 2-5 munits (mUnits) Enzym wurden zu 10 µg (Glyko)peptidsubstraten (entsprechend ungefähr 5 nmol Repeat-Einheiten) in einem Gesamtvolumen von 20 µl Digestionspuffer (s. o.) zugesetzt. Die Reaktionsgemische wurden bei 37 °C inkubiert und 2 µl wurden nach 3 oder 24 Stunden abgezogen und 10 bis 20-fach in 0,1 %iger wässriger TFA vor der MALDI-Massenspektrometrie verdünnt.

Murine dendritische Zellen (10^8) wurden durch Feinnadelaspiration auf Eis unter Verwendung von 1 ml von 0,3 M Saccharose, 0,01 M Hepes als Puffer (ohne Protease-Inhibitoren) homogenisiert. Nach Verdünnung auf 7 ml und Zentrifugation bei 850 g für 10 Minuten zur Entfernung intakter Zellen und Kerne wurden 6 ml des Überstandes über 24 ml 35 % Percoll mit 0,3 M Saccharose, 0,01 M Hepes für 105 Minuten bei 20.000 UpM in einer Zentrifuge (Modell J2-21 M/E, Rotor: JA-20, Beckman Instruments, München, Deutschland) (15) zentrifugiert. Der Gradient wurde durch einen Schwerkraftsiphon (30×1 ml) fraktioniert und jede Fraktion wurde nach Beschallung durch Enzymimmunoassay mit einem anti-H2-Antikörper auf Gegenwart von MHC-Klasse-II-Moleküle und auf β -Hexosaminidase-Aktivität (15) und Cathepsin-L-bezogene proteolytische Aktivität unter Verwendung von TAP25-Peptid als Substrat (5 μ g), untersucht. Die Proben wurden 24 Stunden bei 37 °C inkubiert, 20-fach in wässriger TFA verdünnt und durch MALDI-Massenspektrometrie untersucht. Zur spezifischen Hemmung der Cathepsin-L-Aktivität wurden die entsprechenden Fraktionen mit 1 μ m Z-Leu-Leu-Leu-fluormethylketon (Sigma) vermischt.

15

Prozessierung von MUC1-Glykopeptiden durch murine dendritische Zellen

In einer Reihe von Experimenten wurde eine Vielzahl von Anwendungsarten für das Pulsen von dendritischen Zellen mit Antigenen durch Anwendung konfokaler Lasermikroskopie und Fluoreszenz-aktiviertem Zellsortieren in der kinetischen Analyse von Cy3-markiertem MUC1-Peptid (100mer) getestet. Gemäß den quantitativen FACScan-Daten nahm der Anteil der Fluoreszenz-markierten Zellen mit der Zeit bis zu 2 Stunden zu, jedoch noch mehr mit der Art der Antigen-Aufbringung als freies Peptid, als Peptid-Antikörperkomplex oder als Konjugate an paramagnetischen Eisenoxid-Kügelchen. Die letzteren wurden von den Zellen am effektivsten unabhängig von der Größe der Kügelchen (50 nm oder 1 μ m Durchmesser) und unabhängig von der Art der Peptid-Bindung an die Kügelchen über immobilisiertes Streptavidin, anti-MUC1-Antikörper (C595, B27.29) oder Helix pomatia Agglutinin (im Falle von GalNAc-substituierten Glykopeptiden) eingebaut. Während nach einer zweistündigen Inkubationszeit mehr als 80 % der Maus-DCs mit Antigen-beschichteten Kügelchen (1 μ m) beladen waren, wurde bei Peptid-Antikörperkomplexen ein Anteil von nur 15-20 % und bei freiem Peptid-Antigen von unter 5 % erreicht. Demgemäß waren alle Versuche, Peptid-Prozessierungsprodukte nach Pulsen mit freiem Antigen oder Antigen-Antikörperkomplexen zu identifizieren, nicht erfolgreich.

Maus-DCs wurden an AIMV-Medium angepasst und 4 Stunden mit einem Gemisch aus biotinylierten Glykopeptiden (H1 bis H6) gepulst, die an Antikörper- und Lectin-beschichtete Kügelchen gebunden waren. Drei Fraktionen, nämlich das magnetisch getrennte Zell-Pellet, das zentrifugierte Zell-Pellet und der Überstand wurden auf das Vorhandensein proteolytischer Fragmente untersucht, die von den 21mer GalNAc-Peptiden abgeleitet waren (Fig. 1). Eine Peptid-Isolierung wurde durch magnetische Trennung auf Streptavidin-beschichteten Kügelchen nach Inkubation mit Zellextrakten oder Überstand oder durch Umkehrphasen-Festphasenextraktion auf Poros C18 durchgeführt. Die Fraktionen wurden durch MAL-DI(tof)-Massenspektrometrie, um das Massmuster der Peptidprodukte zu gewinnen und durch Nanoflow-LC-ESI-Massenspektrometrie im MS/MS-Modus analysiert, um die Sequenzinformation zu gewinnen. Die in Fig. 1 dargestellten Ergebnisse zeigen eine umfassende Fragmentierung der Glykopeptide an, wobei der Überstand überwiegend prozessierte Produkte enthielt, wohingegen die Zellfraktionen ebenfalls beträchtliche Anteile an restlichen 21mer-Glykopeptiden enthielten. Die AHG21-Glykopeptide AHGVT-SAPD(E)T(S)RPAPGS TAPP(A)A (substituiert mit einem GalNAc-Rest) wurden jeweils bei m/z 2249,0 und 2223,0 identifiziert, entsprechend den Massen von N-thiopropionyliertem H1 bis H3 (m/z 2249,0) und H4 bis H6 (m/z 2223,0). Die einzigen identifizierten Produkte wurden jeweils bei m/z 1695,7 (P1) und bei m/z 1669,7 (P2) registriert, entsprechend den GalNAc-enthaltenden Peptidfragmenten SAP16. Die Sequenz der beiden Peptidprodukte (P1, P2) wurde durch MS/MS auf einem Qtof2-Gerät bestätigt und umfasste 16 Aminosäure lange C-terminale Anteile der AHG21-Glykopeptide (Fig. 2),

P1 SAP_DTRPAPGSTAP_PA (SEQ ID NO: 7) und

P2 SAP_ESRPAPGSTAP_AA, (SEQ ID NO: 8)

die beide GalNAc an Thr/Ser10 oder Thr17 (Nummerierung gemäß der AHG21-Sequenz) enthielten. Keine SAP16-Peptide ohne GalNAc wurden jeweils bei m/z 1492 und 1466 registriert, was darauf hinweist, dass die Proteolyse von AHG21 mit GalNAc an Thr5, das neben der Spaltstelle vorlag, nicht eintrat. Eine Sequenzierung der verbleibenden AHG21-Glykopeptide durch MS/MS-Analyse zeigte, dass sich das GalNAc vorzugsweise an Thr5 befand, was mit der Annahme übereinstimmt, dass unverdaute Protease-resistente AHG21-

Glykopeptide mit H1 bzw. H4 identisch waren (Fig. 2). Das 5 Aminosäure lange N-terminale proteolytische Fragment AHGVT (N-thiopropionyliert) wurde in keinem der Spektren nachgewiesen. Kontrollexperimente mit DC-geprägten AIMV-Medien ohne Antigen (4 Stunden) zeigten an, dass keine proteolytische Aktivität in das Medium sezerniert wurde, was eine nachweisbare Endopeptidase-Spaltung des TAP25-Peptids nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C zur Folge hatte. Jedoch wurde nach Einstellung des Überstands auf Bedingungen, die für Cysteinproteasen optimal waren (pH 5,5, 1 mM Dithiotreitol) eine geringere Exopeptidase-Spaltung des Peptids im Massenspektrum (Daten nicht dargestellt) registriert. Daher können die SAP16-Fragmente, die in den Überständen von Antigen-gepulsten Zellen nachgewiesen wurden, als zelluläre Produkte und nicht als extrazelluläre Produkte sezernierter Proteasen angesehen werden.

In-vitro-Proteolyse von MUC1-Glykopeptiden mit humanem Cathepsin-L

Um die Prozessierungsdaten zu verifizieren, die mit Maus-DCs gewonnen wurden, und um die vorgeschlagene Identität der vorzugsweise involvierten Protease(n) zu bestätigen, führten wir eine Reihe von *in vitro*-Digestionen mit Cathepsin-L und ausgewählten Peptidsubstraten (Tabelle 1, Fig. 3) durch. Unter Anwendung von Standardbedingungen für Cysteinproteasen und Inkubationszeiten von 3 Stunden war das Enzym dazu in der Lage, alle nicht-glykosylierten MUC1-Repeatpeptide quantitativ zu spalten, außer der Variante GST20-AES-Peptid (80 % Spaltung). Ungeachtet der Startamino-säure-Position in der Repeat-Sequenz (TAP, AHG, GST) und der Länge der Peptide (20mer, 21mer, 25mer, 100mer) spaltete Cathepsin-L im VTSA-Motiv des Repeatpeptids spezifisch zwischen Thr-Ser. Außer dieser bevorzugten Spaltstelle, die in Übereinstimmung mit den *in vivo*-Daten steht, stellte sich heraus, dass geringere Aktivitäten der Enzymzubereitung auf die angrenzenden Positionen Val-Thr (TSA17 bei m/z 1959) und Ser-Ala (APD15 bei m/z 1771) gerichtet waren. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Aminopeptidasen für die Erzeugung dieser kleineren Produkte verantwortlich sein könnten, wurde ein geschütztes Substrat, das am Amino-Terminus eine Biotin-Markierung trug, als Substrat verwendet (Fig. 3A). Ebenso in Übereinstimmung mit der DC-vermittelten Prozessierung war die Erkenntnis, dass O-glykosylierte Peptide, die GalNAc oder Gal β 1-3 GalNAc trugen, effektiv digeriert wurden (Tabelle 1, Fig. 3B). Darüber hinaus stellte sich heraus, dass die Position der Glykan-Bindung an eines der drei Threonine (Thr5,

Thr10, Thr17) in der AHG21-Sequenz entscheidend ist, wie es durch die *in vivo*-Daten nahegelegt ist. Während GalNAc oder Gal β 1-3 GalNAc in von der Spaltstelle entfernteren Positionen (Thr10, Thr17) keinen Einfluss auf die Spaltung durch Cathepsin-L aufwiesen, waren die Glykopeptide H1 und H4, die beide an der Spaltstelle (Thr5) glykosyliert waren, gegenüber einer Proteolyse stabil. Eine geringere Exopeptidase-Aktivität war (im Falle dieser Glykopeptide) in der Cathepsin-L-Zubereitung aus menschlicher Leber nachweisbar. Als Kontrolle wurde menschliches Cathepsin-D mit einer Auswahl an MUC1-Repeatpeptiden und Glykopeptiden getestet, und es stellte sich heraus, dass es nicht dazu in der Lage war, irgendeines von diesen sogar dann, wenn Inkubationszeiten von bis zu 24 Stunden ausgewählt wurden, als Substrat zu verwenden. Es kann gefolgert werden, dass die proteolytische Aktivität in der menschlichen Cathepsin-L-Zubereitung alle Hauptaspekte der MUC1-Glykopeptid-Prozessierung *in vivo* durch Maus-DCs zusammenfasste.

In-vitro-Proteolyse von MUC1-Glykopeptiden mit Enzymen in endosomalen Fraktionen mit niederer Dichte aus murinen dendritischen Zellen

Murine dendritische Zellen wurden in Abwesenheit von Protease-Inhibitoren aufgebrochen und der Überstand nach Entfernung der Kerne in einem Percoll-Gradienten zentrifugiert. Die Gradientenfraktionen wurden auf ihre proteolytische Aktivität unter Verwendung von TAP25 als Substrat getestet und unter Verwendung von Inkubationsbedingungen, die für Cysteinproteasen optimiert waren (Fig. 4). Endosomen mit niederer Dichte wurden aus Lysosomen gemäß der Registrierung von Marker-Proteinen (β -Hexosaminidase) abgetrennt und es wurde gezeigt, dass sie eine Cysteinprotease enthielten, die mit Z-Leu-Leu-Leu-fluormethylketon nicht hemmbar war und mit einer Ortsspezifität, die mit humanem Cathepsin-L in Beziehung stand. Nur Enzyme in Fraktionen mit einer Dichte um 1,037 g/ml spalteten das TAP25-Peptid und H3/H6 Glykopeptide an Thr-Ser, wodurch SAP16 gewonnen wurde, während alle Fraktionen, insbesondere diejenigen mit Dichten von über 1,054 g/ml, beträchtliche Aktivitäten von Carboxypeptidase(n) enthielten (Fig. 4).

Die hier vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal eine Einsicht in die Prozessierung des humanen Glykoprotein-Tumorantigens MUC1 durch DCs. Unter Verwendung von Methodologien aus dem Stand der Technik zur Strukturcharakterisierung von Peptiden/Glykopeptiden

war diese Studie dazu in der Lage, vier bedeutende Fragen betreffend der MUC1-Proteolyse durch APCs im MHC-Klasse-II-Weg zu beantworten: 1) Welche sind die Spaltstellen im MUC1-Repeat-Peptid? 2) Auf welchem Wege beeinflussen O-gebundene Glykane die proteolytische Spaltung? 3) Werden Kerntyp-Glykane vor der proteolytischen Prozessierung entfernt? 4) Welche der in den Prozessierungsmechanismus involvierten Enzyme sind für die proteolytische Spaltung von MUC1-Repeat-Peptiden verantwortlich? Unsere Ergebnisse zeigen, dass MUC1-Repeats an zwei Stellen, nämlich zwischen Thr-Ser im VTSA-Motiv und zwischen His-Gly gespalten werden. Während der *in vivo*-Prozessierung wurden die Core-type-Glykane GalNAc und Gal β 1-3 GalNAc nicht entfernt, hemmten jedoch die Spaltung, wenn sie sich neben der Spaltstelle befanden. Die obigen Aspekte, insbesondere die Ortsspezifität der Spaltung und die ortsabhängigen Wirkungen der Kohlenhydrate wurden unter Verwendung von menschlichem Cathepsin-L *in vitro* perfekt simuliert. Weil dieses Enzym zur Cystein-Protease-Familie gehört, die mit Papain verwandt ist und von der beansprucht wird, dass sie in die Antigen-Prozessierung involviert ist (7, 8), bestätigten wir weiter die Einbeziehung von Cathepsin-L (oder einer eng verwandten Enzymspezies) in die MUC1-Repeat-Proteolyse durch spezifische Hemmung. Es kann angenommen werden, dass die Antigen-Prozessierung in späten Endosomen durch eine Familie von Proteasen mit teilweise überlappenden, jedoch noch verschiedenen Spezifitäten vermittelt wird. Daher schließen die *in vitro*-Daten über die Cathepsin-L-Spaltung von MUC1, die in diesem Dokument präsentiert wird, nicht die Beteiligung anderer, Cathepsin-L-verwandter Enzyme in den Prozessierungsschritten aus, die zu einer spezifischen Spaltung von MUC1 ein.

Das Peptid SAP17 oder die glykosylierten Derivate, die O-gebundene Glykane an den mehr C-terminalen Thr- und Ser-Positionen tragen, können die bevorzugten, wenn nicht exklusiven Prozessierungsprodukte von MUC1-Repeats in DCs darstellen. Die strukturellen Merkmale dieser Produkte stimmen mit Erkenntnissen aus einer immunologischen Studie überein, die parallel durchgeführt wurde¹. Gemäß dieser Arbeit bleiben Glykane während der Prozessierung von MUC1-Glykopeptiden durch DCs intakt, beeinflussen jedoch die Aktivierung von T-Zell-Hybridom-Klonen in einer ortsspezifischen Weise. Klon VF5, der mit einem Peptidpitop reaktiv ist, das das DTR-Motiv aufweist, wurde durch humane DCs, gepulst mit AHG21-Glykopeptiden, aktiviert, die Glykane an Ser16 oder Thr 17 trugen. Keine Zunahme der IL-2-Produktion durch diesen Klon war jedoch messbar, wenn die Glykane am vorge-

schlagenen Epitop oder an den Thr-Ser-Positionen neben der Spaltstelle angeordnet waren, die in der vorliegenden Studie definiert wurden (Thr5, Ser6). Daher können die O-gebundenen Glykane die ortsspezifische proteolytische Prozessierung oder Präsentation der MHC-Klasse-II-restringierten Glykopeptide verändern. Dass Glykane die Präsentation von Glykopeptiden auf MHC-Klasse-II negativ beeinflussen, kann nicht verallgemeinert werden, weil eine effektive MHC-Klasse-II-Präsentation von Glykopeptiden und eine Aktivierung von T-Zellen (16) gezeigt wurde. Es existieren Belege dafür, dass Glykane nicht nur negative Auswirkungen auf die DC-vermittelte Prozessierung und T-Zell-Aktivierung aufweisen. Wir haben damit in Übereinstimmung ein T-Zell-Hybridom VF9 erzeugt und charakterisiert, das mit MHC-Klasse-II-präsentierten MUC1-Glykopeptiden reaktiv ist, die an Thr5 in der AHG21-Sequenz Gal β 1-3 GalNAc tragen¹. Das spezifische Epitop dieses T-Zell-Hybridom-Klons FV9 unterstellt, dass ein 21mer Glykopeptid den Prozessierungsmechanismus ungespalten durchläuft und als solches auf MHC-Klasse-II-Proteinen präsentiert wird. Somit überleben O-gebundene Glykane nicht nur den Prozessierungsmechanismus auf APCs und werden auf MHC-Klasse-II-Proteinen präsentiert, sie können auch in die Epitop-Struktur involviert sein, die von T-Zell-Rezeptoren erkannt werden. Auf dieser Grundlage kann hypothetisch verallgemeinert werden, dass Glykane auf diese Weise zu einer größeren Diversifikation der Immunreaktion gegenüber dem redundanten Proteinkern von MUC1 beitragen können.

Es wurde beansprucht, dass Tumor-assoziiertes MUC1, insbesondere die Glykoformen von Brustkrebszellen, unterglykosylierte Proteinkerne zeigen (17), was sich auf beides bezieht, sowohl auf verkürzte Kettenlängen als auch auf eine reduzierte Anzahl von glykosylierten Stellen pro Repeatpeptid. Wir konnten kürzlich zeigen, dass diese Annahme nur teilweise korrekt ist, weil die Strukturanalyse von MUC1-Proben, die in vier unterschiedlichen Brustkrebs-Zelllinien rekombinant exprimiert wurden, erhöhte O-Glykosylierungsdichten (18) zeigten. Darüber hinaus unterschieden sich die Muster der O-gebundenen Ketten zwischen individuellen Zelllinien stark, was darauf hinweist, dass kein gemeinsames Brustkrebs-assoziiertes Profil existiert. Letztendlich wurde die vorgeschlagene Verschiebung von Core-2-basierten Glykanen zu Core-1 nicht verifiziert, ganz im Gegenteil, es wurde gezeigt, dass Core-2 die vorherrschende strukturelle Grundlage der Krebs-assoziierten Glykane bildete. Ein durchschnittliches Profil der O-gebundenen Glykane, das für MUC1 aus gepoolten Ascites-Proben von Brust- und Pankreaskrebspatienten ermittelt wurde, stimmte ebenfalls mit einer

komplexeren, Core-2-basierten Glykosylierung überein (19). Interessanterweise repräsentiert diese Glykoform des Mucins ein schwaches Immunogen im MHC-Klasse-I-Weg (20) und ist im MHC-Klasse-II-Weg nicht immunogen (14). Das letztere Phänomen wurde einem „Festhalten“ des Antigens in frühen Endosomen von DCs zugeschrieben, das durch eine multivalente, hoch-afide Wechselwirkung mit dem Mannose-Rezeptor (14) vermittelt wurde. Es kann demgemäß geschlossen werden, dass die O-Glykosylierung von MUC1 in erster Linie das „Trafficking“ von endozytiertem Mucin stört. Später, wenn die spät-endosomalen Kompartimente für das Antigen zugänglich sind, können auch andere Störarten, die durch O-gebundene Glykane vermittelt werden, zum Zuge kommen, wie eine sterische Hemmung der Proteolyse. Die Existenz derartiger Einschränkungen, die durch eine ortsspezifische O-Glykosylierung eingeführt wurden, werden in der vorliegenden Studie offensichtlich, weil an Thr-Ser im VTSA-Motiv von MUC1-Repeats gebundene Glykane die Prozessierung der Glykopeptide verhinderten. Die spezifische Proteolyse des MUC1-Peptids durch Cathepsin-L würde ebenfalls die Beobachtung erklären, dass ein Tn-100mer-Peptid mit insgesamt 15 GalNAc-Resten, gebunden an jedes Thr5, Ser16 und Thr17 (Nummerierung gemäß der AHG20-Sequenz) nicht dazu in der Lage war, Th-Zell-Klone zu aktivieren¹. Daher muss die ortsspezifische Glykan-Substitution, nicht notwendigerweise die Glykan-Struktur, bei der Entwicklung von Krebsvakzinen beachtet werden. Weil nicht alle glykosylierten Epitope für die MHC-Klasse-II-Präsentation verfügbar waren, präsentieren SAP17 und dessen glykosylierte Derivate eine "vorprozessierte" Form, die zur internen oder externen Beladung auf MHC-Klasse-II-Moleküle in immuntherapeutischen Ansätzen geeignet ist. Bei Beladungsexperimenten mit SAP17 können die Glykosylierungs-abhängigen Wirkungen auf die Bindung an MHC-Klasse-II-Proteine und an die T-Zell-Rezeptoren durch systematische Variation der Substitutionsorte und Strukturen der Glykane untersucht werden.

Literatur:

1. Kotera, Y., Fontenot, D.J., Piecher, G., Metzgar, R.S., Finn, O.J. (1994) *Cancer Res.* **54**, 2856 - 2860
- 5 2. Barnd, D.L., Lan, M.S., Metzgar, R.S., Finn, O.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7159 - 7163
3. Hilken, J., Kroezen, V., Bonfrère, J.M., De Jong-Bakker, M., Bruning, P.F. (1986) *Cancer Res.* **46**, 2582 - 2587
4. Agrawal, B., Reddish, M.A., Krantz, M.J., Longenecker, M.B. (1995) *Cancer Res.* **55**,
10 2257 - 2261
5. Karanikas, V., Hwang, L.A., Pearson, J., Ong, C.S., Apostolopoulos, V., Vaughan, H., Xing, P.X., Jamieson, G., Pietersz, G., Tait, B., Broadbent, R., Thynne, G., McKenzie, I.F.C. (1997) *J. Clin. Invest.* **100**, 2783 - 2792
6. Goydos, J.S., Elder, E., Whiteside, T.L., Finn, O.J., Lotze, M.T. (1996) *J. Surg. Res.*
15 **63**, 298 - 304
7. Nakagawa, T.Y., Rudensky, A.Y. (1999) *Immunol. Rev.* **172**, 121 - 129
8. Honey, K., Duff, M., Beers, C., Brissette, W.H., Elliott, E.A., Peters, C., Maric, M., Cresswell, P., Rudensky, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 22573 - 22578
9. Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., Rock, K.L. (1997) *J. Immunol.* **158**, 2723 - 2730
- 20 10. Karsten, U., Diotel, C., Klich, G., Paulsen, H., Goletz, S., Müller, S., Hanisch, F.-G. (1998) *Cancer Res.* **58**, 2541 - 2549
11. Hanisch, F.-G., Müller, S., Hassan, H., Clausen, H., Zachara, N., Gooley, A.A., Paulsen, H., Alving, K., Peter-Katalinic, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 9946 - 9954
12. Hanisch, F.-G., Reis, C.A., Clausen, H., Paulsen, H. (2001) *Glycobiology* **11**, 731 -
25 740
13. Müller, S., Alving, K., Peter-Katalinic, J., Zachara, N., Gooley, A.A., Hanisch, F.-G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 18165 - 18172
14. Hiltbold, E.M., Vlad, A.M., Ciborowski, P., Watkins, S.C., Finn, O.J. (2000) *J. Immunol.* **165**, 3730 - 3741
- 30 15. Barnes, K.A., Mitchell, R.N. (1995) *J. Exp. Med.* **181**, 1715 - 1727

16. Jensen, T., Hansen, P., Galli-Stampino, L., Mouritsen, S., Frische, K., Meinjohanns, E., Meldal, M., Werdelin, O. (1997) *J. Immunol.* **158**, 3769 - 3778
17. Lloyd, K.L., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B.W.T., Taylor-Papadimitriou, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 33325 - 33334
- 5 18. Müller, S., Hanisch, F.-G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 26103 - 26112
19. Beatty, P., Hanisch, F.-G., Stolz, D.B., Finn, O.J., Ciborowski, P. (2001) *Clin. Cancer Res.* **7**, 781 - 787
20. Hiltbold, E.M., Alter, M.D., Ciborowski, P., Finn, O.J. (1999) *Cell. Immunol.* **194**, 143 - 149

10

Fußnoten:

- 1) Vlad, A., Müller, S., Cudic, M., Paulsen, H., Otvos, L., Hanisch, F.-G., Finn, O.J. (2002) *J. Exp. Med.* **196**, 1435 - 1446

PATENTANSPRÜCHE

1. Peptidfragment der Tandem-Repeat-Domäne von MUC1, das mit der Aminosäuresequenz SAP beginnt und mindestens 9 Aminosäuren umfasst.
5
2. MUC1-Peptidfragment nach Anspruch 1, wobei das MUC1-Fragment 10-25 Aminosäuren aufweist.
3. MUC1-Peptidfragment, das eine Aminosäure nach SEQ ID NO: 1-4 oder 11 oder Varianten hiervon umfasst, wobei die Varianten eine oder mehrere Insertionen, Substitutionen und/oder Deletionen im Vergleich zur Sequenz von SEQ ID NO: 1-4 oder 11 umfassen, und bei denen die biologische Aktivität im Wesentlichen der Aktivität des Peptids, das die unmodifizierte Aminosäuresequenz von SEQ ID NO: 1-4 oder 11 umfasst, gleich ist, und vorausgesetzt, dass die Varianten mit der Aminosäuresequenz SAP beginnen und mindestens 9 Aminosäuren umfassen.
10
15
4. MUC1-Peptidfragment nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, wobei ein oder mehrere der Threonine oder Serine des Peptidfragments O-glykosyliert sind.
5. MUC1-Peptidfragment nach Anspruch 4, das einer der SEQ ID NO: 1 bis 4 oder 11 entspricht, wobei die Aminosäure an Thr5 und/oder 12 glykosyliert ist.
20
6. Nukleinsäure, die ein MUC1-Peptidfragment nach einem der Ansprüche 1 bis 3 kodiert.
25
7. Verfahren zur Erzeugung der MUC1-Peptidfragmente nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, das die folgenden Schritte umfasst:
30
 - a) Bereitstellung eines Peptids, das die Tandem-Repeat-Domäne von MUC1 oder einen Teil hiervon umfasst, wobei der Teil zumindest eine Wiederholungseinheit der Tandem-Repeat-Domäne von MUC1 enthält,
 - b) In-Berührung-Bringen des Peptids aus a) mit einer wirksamen Menge von Cathepsin-L oder einem eng verwandten Enzym hiervon, wodurch das Peptid gespalten wird, und

c) Isolieren der in b) erzeugten Fragmente.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das in Schritt a) bereitgestellte Peptid natürliches MUC1 ist, das aus menschlichen Milchfettmembranen, aus menschlichem Tumor-Aszites oder aus menschlichen Brustkarzinom-Zelllinien gewonnen wird oder durch SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10 oder 12 dargestellt wird.

9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei eine oder mehrere der Aminosäuren des in Schritt a) bereitgestellten Peptids O-glykosyliert sind, vorausgesetzt, dass das Peptid nicht an der Spaltstelle von Cathepsin-L glykosyliert ist.

10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 7 bis 9, wobei ein oder mehrere der Threonine oder Serine des in c) isolierten Peptidfragments O-glykosyliert sind.

11. MUC1-Peptidfragment, das durch ein Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 7 bis 10 gewinnbar ist.

12. *Ex vivo*-Verfahren zur Erzeugung einer Population autologer Antigen präsentierender Zellen (APCs), die zum Induzieren einer effektiven Immunreaktion gegen MUC1 in der Lage sind, das die folgenden Schritte umfasst:

- a) Bereitstellen von autologen APCs von einem Tumorpatienten;
- b) In-Berührung-Bringen der autologen APCs des Tumorpatienten mit einer wirksamen Menge eines MUC1-Peptidfragmentes nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 oder 11 unter Bedingungen, die eine Endozytose, Prozessierung und MHC-Klasse-II-Präsentation der Peptidfragmente durch diese APCs ermöglicht, und
- c) Isolieren der MUC1-Peptid präsentierenden APCs zum Zweck einer immuntherapeutischen Anwendung bei dem Patienten.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die MUC1-Peptidfragmente in b) an Eisenoxidkügelchen gebunden sind.

14. *Ex vivo*-Verfahren zur Herstellung gentechnisch erzeugter APCs, die zum Induzieren einer wirksamen Immunreaktion gegen MUC1 in der Lage sind, das die folgenden Schritte umfasst:

- a) Bereitstellen einer Nukleinsäure, die für eines der MUC1-Peptidfragmente nach Anspruch 1 bis 5 oder 11 kodiert,
- b) Transfizieren der APCs mit der Nukleinsäure und
- c) Auswählen von APCs, die die MUC1-Peptidfragmente in einer MHC-Klasse-II-restringierten Weise präsentieren.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Nukleinsäure in Schritt a) in einem Expressionsvektor bereitgestellt wird.

16. APC, die durch das Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 15 gewinnbar ist.

17. APC nach Anspruch 16, die eine dendritische Zelle oder eine B-Zelle ist.

18. Therapeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Menge des MUC1-Peptidfragmentes nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 oder 11 oder der APCs nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 oder 17 und einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfasst.

19. Therapeutische Zusammensetzung nach Anspruch 18, die eine Vakzine ist.

20. Verwendung der therapeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 18 oder 19 in der Behandlung von Brustkrebs- oder anderen MUC1-positiven Karzinomen, einschließlich kolorektalem Karzinom, Pankreaskarzinom und Magenkarzinom.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft MUC1-Peptidfragmente und betrifft Verfahren zur Herstellung solcher Peptidfragmente. Die Erfindung betrifft weiterhin ein *ex vivo*-Verfahren zur
5 Herstellung einer Population autologer Antigen präsentierender Zellen (APCs) und zur Herstellung gentechnisch erzeugter APCs, die zur Induktion von effektiven Immunreaktionen gegen MUC1 in der Lage sind. Die Erfindung betrifft weiterhin APCs, die durch diese Verfahren gewinnbar sind, ebenso wie die Verwendung der oben erwähnten Fragmente und
10 APCs in einer therapeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Brustkrebs und anderen MUC1-positiven Karzinomen, einschließlich kolorektalem Karzinom, Pankreas- und Magenkarzinom.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Cell Center Cologne GmbH

<120> Immunogene MUC1 Glykopeptide

<130> P15395

<150> DE10241207.3

<151> 2002-09-05

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> SAP20

<400> 1

Pro Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala
5 10 15

His Gly Val Thr
20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> SAP20

<400> 2

Ser Ala Pro Glu Ser Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Ala Ala
1 5 10 15

His Gly Val Thr
20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> SAP20

<400> 3

Ser Ala Pro Glu Ser Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala
1 5 10 15

His Gly Val Thr
20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> SAP20

<400> 4

Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Ala Ala
1 5 10 15

His Gly Val Thr
20

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> H1-H3

<400> 5

Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Ala Pro Pro Ala
20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> H4-H6

<400> 6

Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Glu Ser Arg Pro Ala Pro Gly Ser
1 5 10 15

Thr Ala Pro Ala Ala
20

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> P1

<400> 7

Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala
1 5 10 15

<210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> P2

<400> 8

Ser Ala Pro Glu Ser Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Ala Ala
 1 5 10 15

<210> 9

<211> 25

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> TAP25

<400> 9

Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro
 1 5 10 15

Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala
 20 25

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> GST20-AES

<400> 10

Gly Ser Thr Ala Pro Ala Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Glu Ser
 1 5 10 15

Arg Pro Ala Pro
20

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> SAP17

<400> 11

Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala
5 10 15

His

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

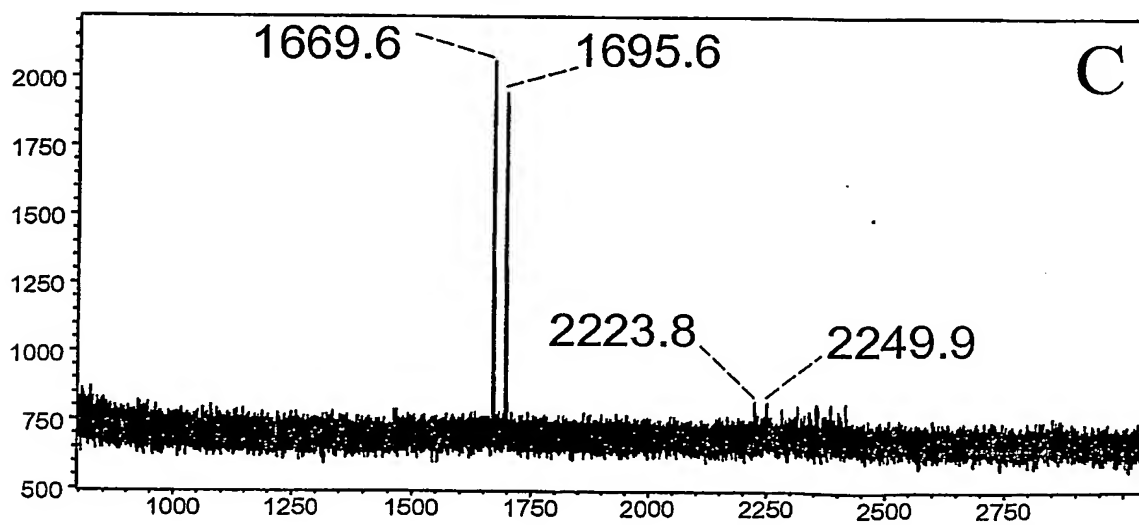
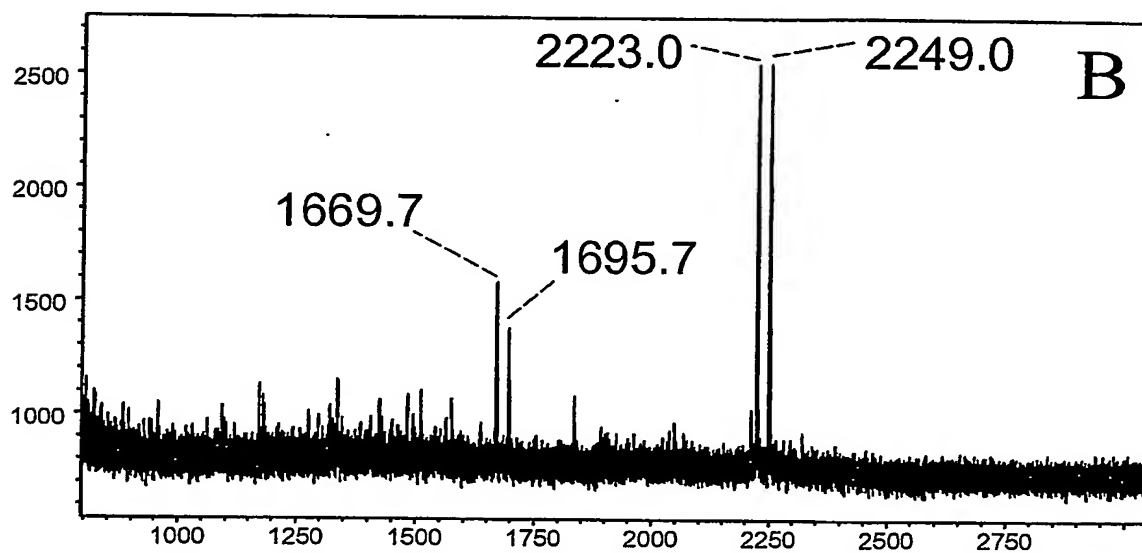
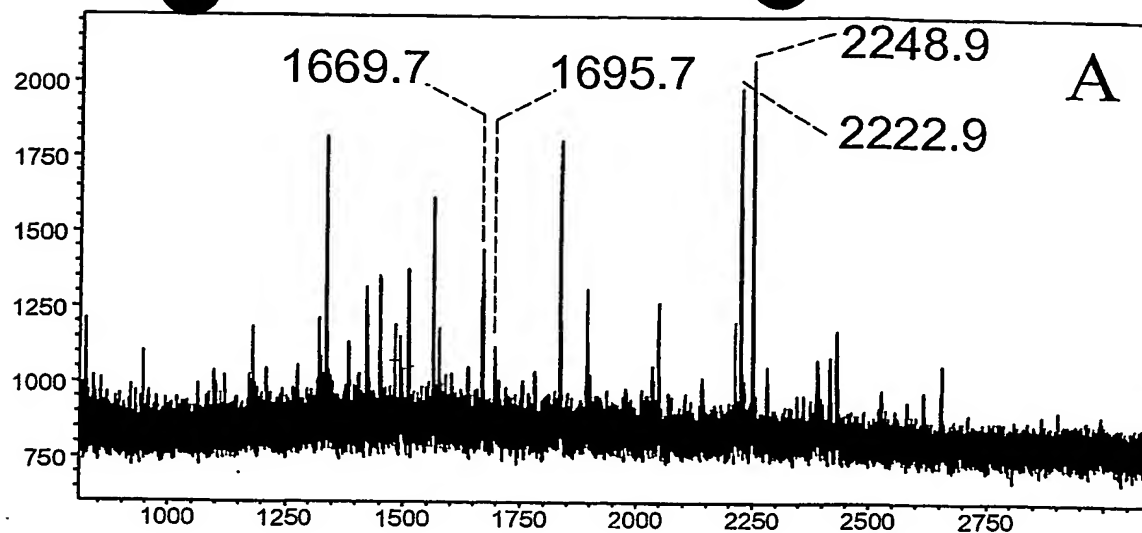
<223> GVT20

<400> 12

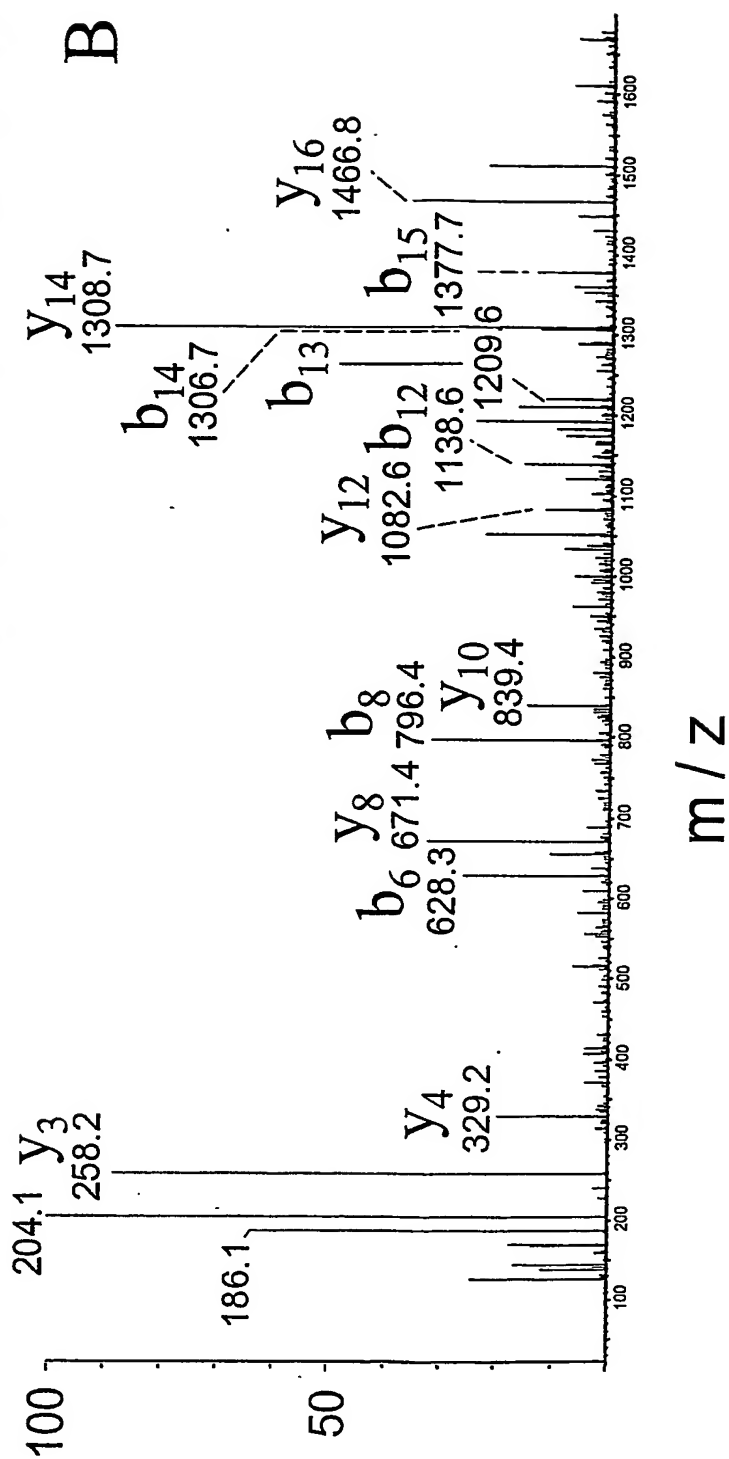
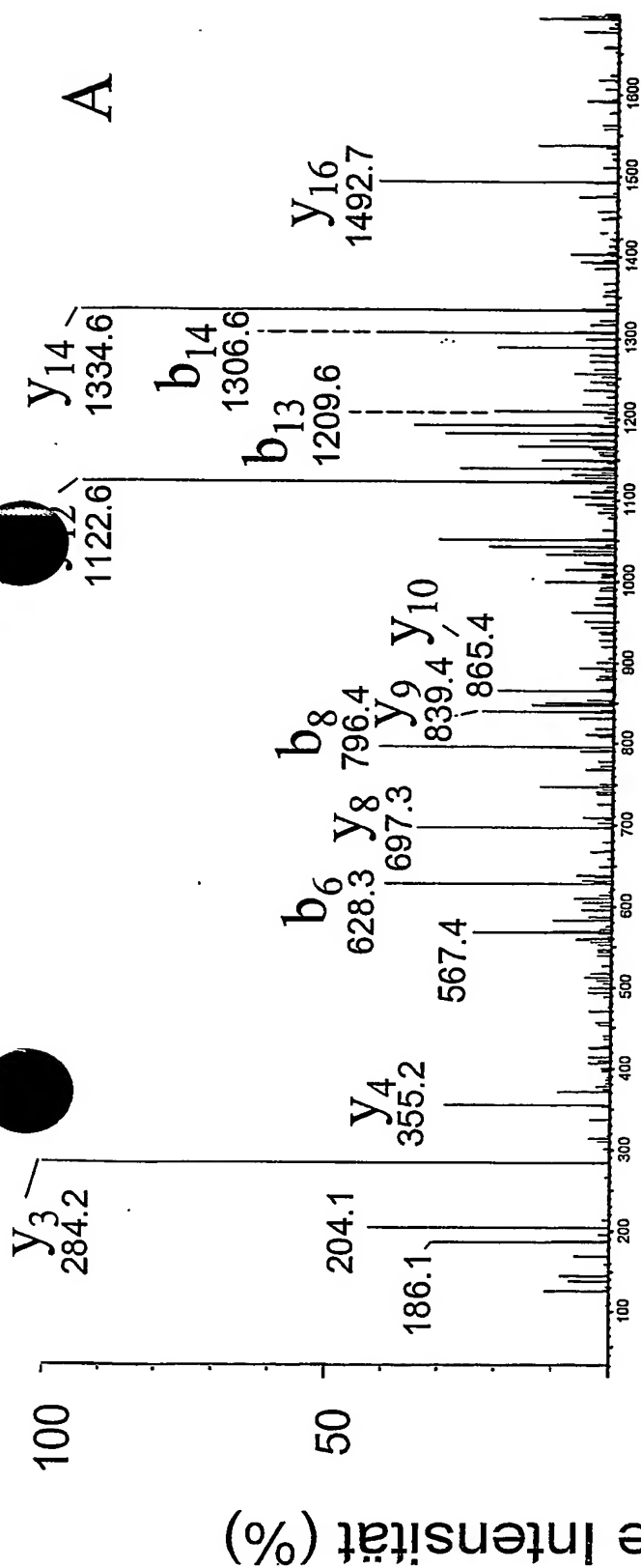
Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
5 10 15

Pro Pro Ala His
20

Relative Intensität

 m/z

FIGUR 1



FIGUR 2A + 2B

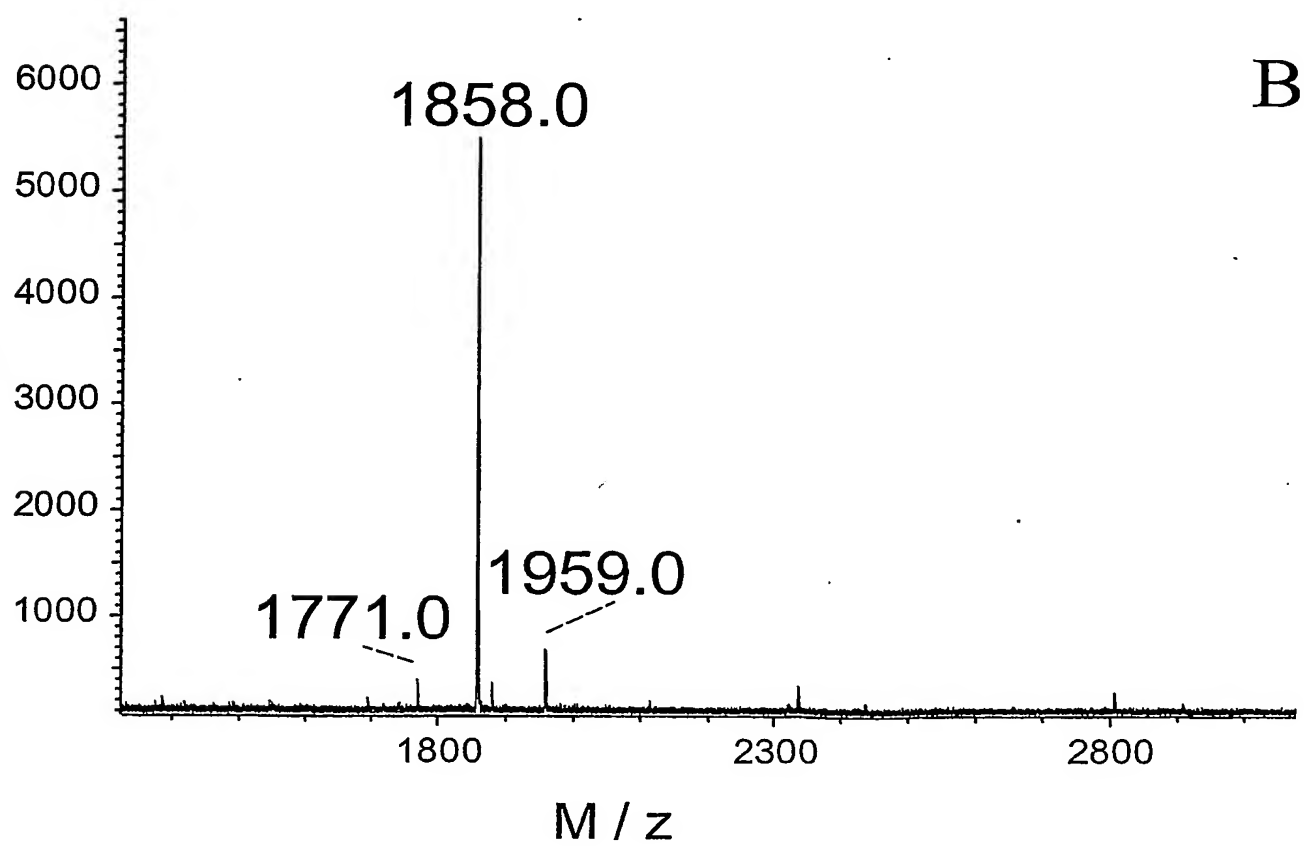
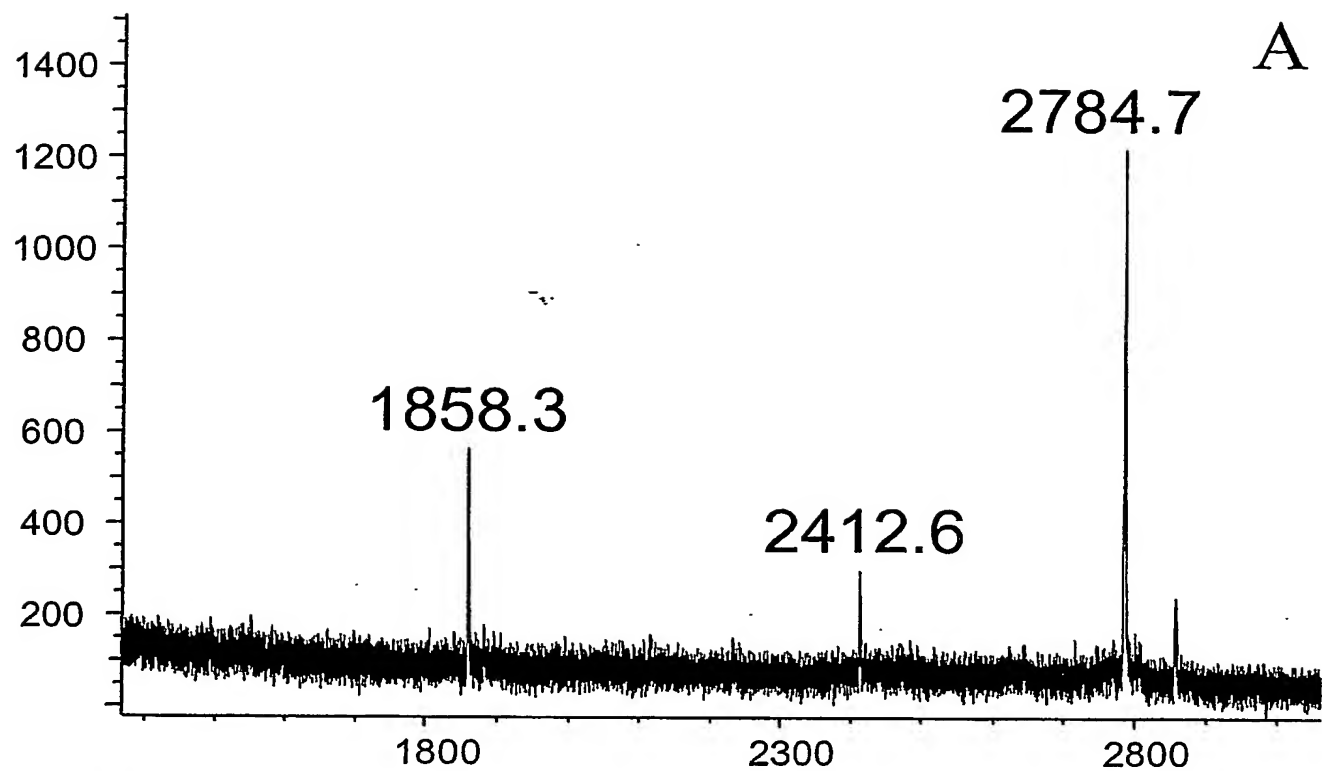
C

Y_{16} Y_{14} Y_{12} Y_{10} Y_9 Y_8 Y_4 Y_3
 SAPDTRPAGSTAPPA
 b_6 b_8 b_{13} b_{14}

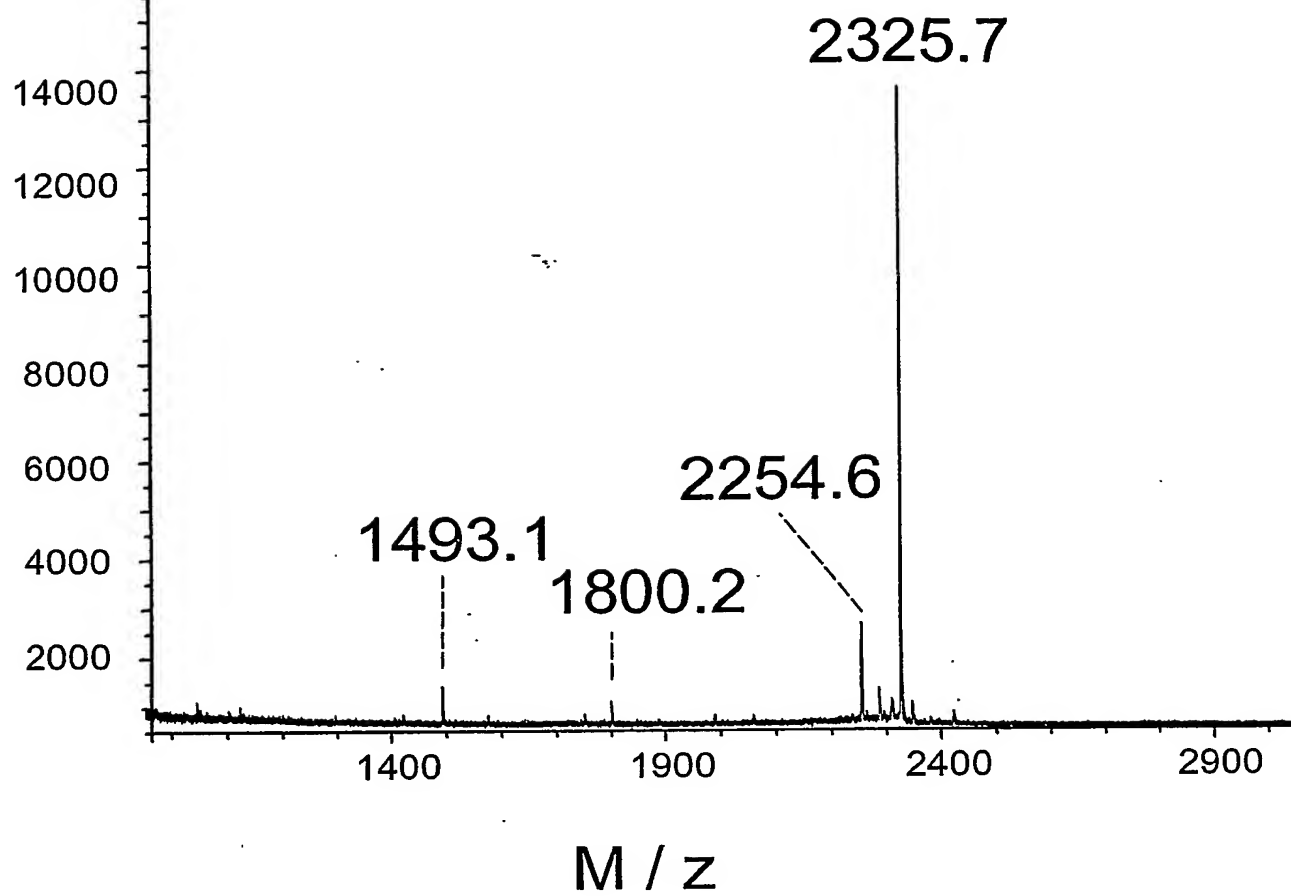
Y_{16} Y_{14} Y_{12} Y_{10} Y_8 Y_4 Y_3
 SAPESTRPAGSTAPAA
 b_6 b_8 b_{12} b_{13} b_{15}

FIGUR 2C

Relative Intensity

FIGUR 3

Relative Intensität

FIGUR 4

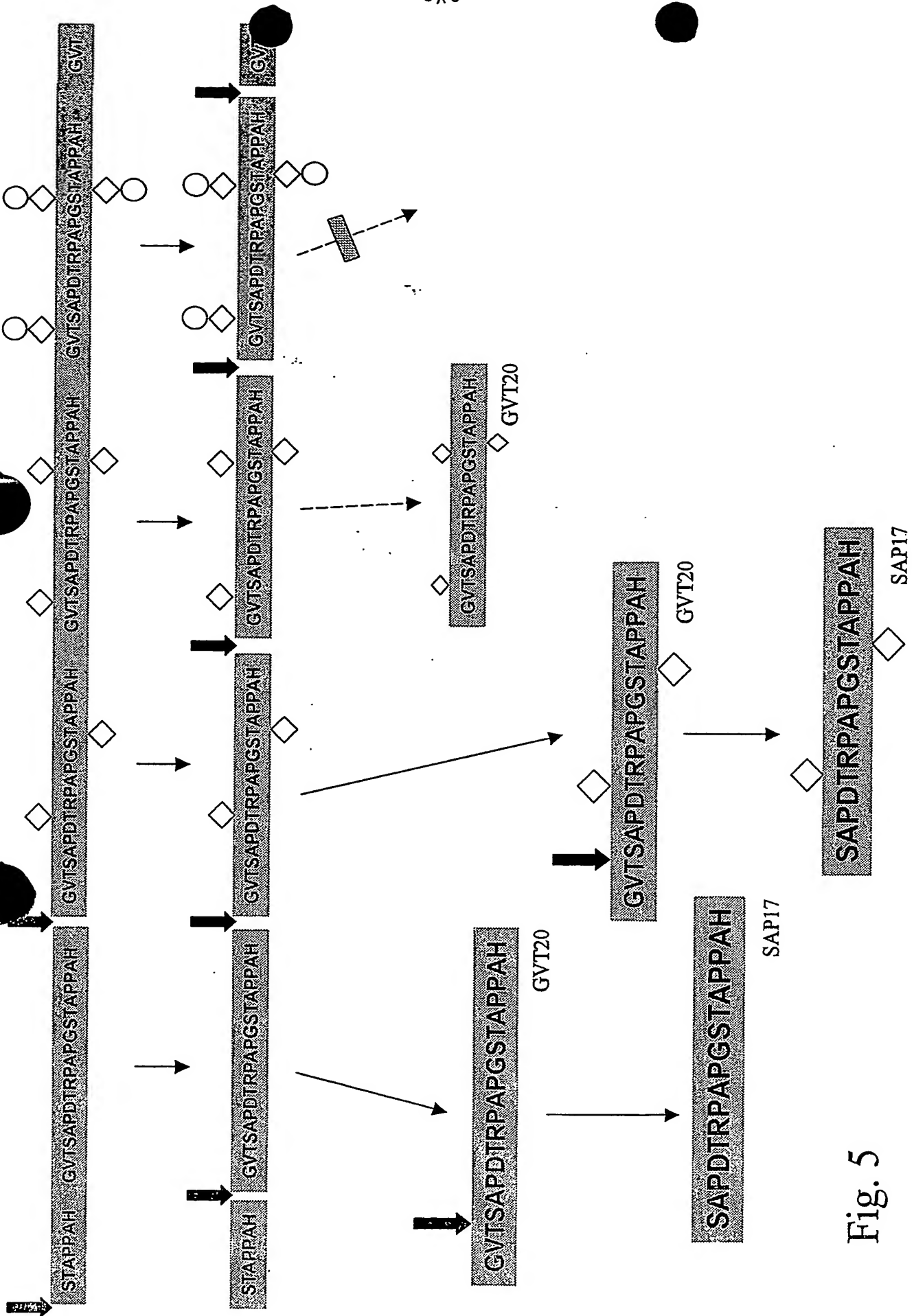


Fig. 5